

OFICINA DE PARTES 21
RECEPCIONADO

Fecha 28.SEP.2018
Hora 15:14
Nº Ingreso 51859



INFORME TECNICO Y DE GESTIÓN FINAL

EJECUTOR:

Nombre	Universidad de Chile
Giro	Universidades
Rut	
Representante	Flavio Andrés Salazar Onfray

NOMBRE DEL PROYECTO: Diseño de Programas de Control de *Botrytis cinerea* medioambientalmente sustentables según sensibilidad a fungicidas base, determinados por qPCR múltiple y la incorporación de fungicidas no residuales.

CODIGO: PYT-2016-0243

Nº INFORME: FINAL

PERIODO: desde Marzo de 2016 hasta agosto de 2018

NOMBRE Y FIRMA COORDINADOR PROYECTO

Nombre	Marcela Angélica Esterio Grez
Rut	
Firma	

I. RESUMEN EJECUTIVO

El objetivo General del proyecto como su nombre lo indica fue Desarrollar programas sustentables de control de Botrytis en uva de mesa de exportación según condición de sensibilidad a moléculas fungicidas claves, determinada tempranamente, mediante técnicas moleculares (qPCR múltiple) e incorporación de moléculas botryticidas no residuales en las principales zonas productoras del país.

Con este propósito para cumplir con lo propuesto se realizaron distintas actividades (Objetivos específicos), las que a continuación se indican:

i) Se desarrolló e implementó una herramienta molecular de detección temprana de pérdida de sensibilidad a Carboxamidas (qPCR-Múltiple-FMCA), en base a la detección de mutaciones que confieren resistencia a Carboxamidas y ii) Se optimizó la herramienta de qPCR implementada en proyecto InovaChile de CORFO para la detección de mutaciones que confieren resistencia a hydroxyanilidas (qPCR-FMCA) en Botrytis cinerea.

Además, y en ambos casos y con el fin de optimizar y aumentar la sensibilidad aún más en los dos procesos, se incorporó y validó el uso de la tecnología HRM (qPCR de alta resolución), adquiriéndose el equipo RotorGene Q6000 (QIAGEN) con fondos extra proyecto FIA generados por la unidad ejecutora.

iii) Se determinaron los cambios en los niveles de sensibilidad a carboxamidas e hydroxyanilidas mediante las herramientas moleculares antes indicadas, los cuales fueron validados mediante secuenciación (Macrogen USA), y análisis microbiológicos tradicionales de sensibilidad e infección sobre muestras (flores o bayas), obtenidas desde los distintos predios asociados: Temporada 0 y 1: precosecha 2015/16 y flor y precosecha 2016/17, respectivamente; y temporada 2 del proyecto (flor y precosecha 2017/18).

iv) Conocidos los antecedentes de sensibilidad generados, se evaluó la efectividad de las moléculas alternativas medioambientalmente sustentables para el control de Botrytis y su implicancia en el nivel de sensibilidad a los fungicidas de síntesis para el diseño de Programas pilotos de control.

Las moléculas evaluadas fueron: una formulación de *Trichoderma* sp. (Trichonativa), el extracto de la planta *Melaleuca alternifolia* (Timorex Gold), la formulación de *Bacillus subtilis* strain 713 (Serenade ASO) y una formulación de *Bacillus amiloliquefaciens* (Serifel). El análisis se realizó mediante bio-ensayos bajo condiciones controladas y en campo. En los Bioensayos las 4 formulaciones presentaron un similar comportamiento, y con mayor eficacia en las dosis más altas inhibiendo por igual a los aislados sensibles como resistentes a carboxamidas e hydroxyanilidas. En los ensayos de campo, la incorporación de estas formulaciones botryticidas complementarias no residuales de control en los programas de manejo de Botrytis provocó un cambio en la sensibilidad de las poblaciones de los predios, obteniéndose en algunos de éstos disminución de los aislados resistentes mutantes

asociados y con ello también una disminución de niveles de pudrición final (incremento de eficacia).

v) Finalmente en la última temporada, los programas pilotos evaluados que presentaron un mejor comportamiento en la temporada precedente (2016/17), fueron la base para el Diseño de Programas Premium de Control de Botrytis en los predios seleccionados (1: V R; 5: RM y 4: VI R). Estos programas se evaluaron en la temporada 2017/18, y consideraron la incorporación al inicio en floración, que es uno de los periodos más críticos de infección, el uso de las moléculas fungicidas de mayor eficiencia en el control de botrytis según nivel de sensibilidad, tipo y frecuencia de mutación a carboxamidas e hydroxianilidas predominante en cada predio. Cada una de estas moléculas fue antecedida o precedida con alguna de las alternativas complementarias no residuales, cuando así correspondía.

Los resultados finales de esta importante iniciativa financiada por FIA, nos ha permitido cumplir con lo propuesto: Diseñar al menos 10 programas óptimos de control, los cuales han sido validados en campo respecto de su eficacia de control en la última temporada. Ampliar el conocimiento respecto de la dinámica de las poblaciones de Botrytis y los cambios genéticos asociados a la pérdida de sensibilidad a dos de los grupos fungicidas más importantes en el control químico de Botrytis, las hydroxianilidas y las carboxamidas.

Un resultado no menos importante asociado al proyecto es el haber generado como Laboratorio de Fitopatología Frutal y Molecular el mayor banco de germoplasma de Botrytis caracterizado genéticamente respecto del nivel de sensibilidad a carboxamidas e hydroxianilidas a nivel nacional (2371 y 2372 aislados, respectivamente), como también microbiológicamente respecto de otras moléculas fungicidas de alta eficiencia de uso en Chile (cyprodinil & fludioxonil, Fludioxonil, fenpyrazamine).

vi) Desde el inicio del proyecto a su término, se han desarrollado distintas actividades de extensión, con el apoyo de todos los asociados, difundiéndose los resultados del proyecto a beneficiarios finales de las zonas productoras (Región Metropolitana, V y VI Regiones), en forma oral (Talleres (3), Seminarios (5), Días de Campo (3), más de 70 reuniones técnicas y participación en 1 encuentro regional de FEDEFruta F.G. en Los Andes, y en otros eventos organizados por esta asociación gremial (PMA Fruittrade Latinoamerica, 2016 y en Fruittrade 2017), Además se presentaron resultados parciales en Congresos nacionales (SACH 2016, SOCHIFIT 2017) e internacionales (XVII International Botrytis Symposium), También se difundieron los resultados más relevantes a través de Entrevistas (El Mercurio On line, Revista del Campo, revistas de extensión (RedAgrícola: 3, 2016; 2 en 2017 y 1 artículo in extenso en julio de 2018).

El primer artículo en revista de alto impacto enviado recientemente a International Journal Food Microbiology (26/09/2018; Factor de Impacto: 4.09). Por otro lado es importante informar que por la gran cantidad de resultados generados y la relevancia

de los mismos, es que se están preparando nuevas publicaciones a enviarse a otras revistas científicas de alto impacto, nacionales como extranjeras y preparándose resúmenes con algunos de los resultados finales más relevantes los que serán presentados en el próximo Congreso SOCHIFIT DE 2018 (Noviembre 28-30, U. Austral, Valdivia).

“Estamos ciertos que toda la información generada en este proyecto ha llegado a los productores asociados, cambiando el concepto que ellos tenían sobre las prácticas de monitoreo de sensibilidad, ahora ellos saben que para poder diseñar programas exitosos de control no basta con realizar análisis microbiológicos tradicionales, lo que tienen que conocer es cuál o cuáles son las mutaciones y su frecuencia en las poblaciones predominantes en sus predios, e ir monitoreando cómo va reaccionando esta población frente a cambios en el manejo y particularmente en los cambios del programa de control químico.

Las herramientas moleculares diseñadas y optimizadas en esta iniciativa, permitirán conocer esta información a un valor menor al de la técnica molecular existente hasta antes de esta propuesta.

*Por otro lado, la gran cantidad de información generada **permitirá crear nuevas iniciativas en las cuales nuestro objetivo primario siempre será el productor, manteniéndose de esta forma, el nexo con los productores primarios asociados y generándose nuevos vínculos con otros productores.***

Finalmente, tenemos la certeza de que estos temas como varios otros asociados que se van a ir generando post proyecto, serán también al igual que la presente iniciativa de gran utilidad para la industria de la Uva de Mesa de Exportación de nuestro país,”...

II. TEXTO PRINCIPAL

1. Breve resumen de la propuesta, con énfasis en objetivos, justificación del proyecto, metodología y resultados e impactos esperados.

La uva de mesa es la principal especie del rubro frutícola del país y la Pudrición Gris causada por *Botrytis cinerea* el problema fitopatológico más importante que la afecta. El control químico del patógeno no ha sido del todo satisfactorio, debido entre otros aspectos a la gran variabilidad genética y gran capacidad de generar resistencia a fungicidas que presenta el hongo). Actualmente en Chile, se ha reportado la pérdida de sensibilidad, en distintos niveles, a la gran mayoría de los fungicidas actualmente en uso. Particularmente, importante es la mantención e incremento del nivel de pérdida de sensibilidad a las hydroxylanilidas (representadas actualmente en el país por la formulación original y 2 genéricas) en donde en aislados chilenos las mutaciones estables y más frecuentemente asociadas a resistencia a fenhexamid están presentes en el codón 412 (F412S/V). La pérdida de sensibilidad a carboxamidas no es menos importante (Representada inicialmente por boscalid) sobre todo si consideramos que todas las nuevas moléculas botryticidas de síntesis que se están introduciendo pertenecen a este mismo grupo (fluopyram, isofetamida, pydiflumetofen). En boscalid, las mutaciones más frecuentemente detectadas en Chile correspondían a H272R (52,8%), H272Y (35,42%), H272L (2,1%) (mutaciones en zonas no conservadas del ADN del hongo) y, a P225L (6,25%) y P225H (4,16%) que aparentemente son más importantes porque generan resistencias cruzadas positivas entre las moléculas fungicidas del mismo grupo (1; 3; 4; 5).

Las herramientas de diagnóstico desarrolladas en el presente proyecto, técnica qPCR-Múltiple, tenían por objetivo determinar cuál o cuáles eran las mutaciones más frecuentemente asociadas a la pérdida de sensibilidad a fenhexamid y a boscalid, y su frecuencia, en predios de distinta condición de sensibilidad inicial a éstos: (i) sensible, (ii) resistente a fenhexamid, (iii) resistente a boscalid y (iv) resistente a ambos, y con ello, considerando un uso óptimo de los fungicidas base y la incorporación en épocas específicas de moléculas fungicidas alternativas no residuales como algunas formulaciones de antagonistas biológicos (*Trichoderma* spp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*) o de extractos de plantas también no residuales como la planta del Té (*Melaleuca alternifolia* / Timorex Gold), **diseñar y establecer Programas Efectivos que permitieran controlar *Botrytis* en uva de mesa en las regiones más afectadas del país pero de manera Medioambientalmente y Económicamente Sustentable.**

Con este propósito, durante dos temporadas y media (2015-2016, 2016-2017, 2017-2018), en 5 predios modelos que se seleccionaron de varios otros que formaban parte de la *Plataforma de Sensibilidad online a botryticidas* (Proyecto InnovaChile de CORFO 11BPC-9947), los cuales habían sido categorizados previamente según su comportamiento de sensibilidad a fenhexamid y boscalid y a otras moléculas fungicidas de acción botryticidas en al menos 3 temporadas consecutivas, y también en 5 predios nuevos en los que se desconocía su condición inicial de sensibilidad, se procedió a *analizar el comportamiento de sensibilidad a estos dos fungicidas y a sus moléculas homólogas y su correspondencia con la presencia o ausencia de las mutaciones asociadas con el desarrollo de resistencia a éstas.*

Esta información era fundamental para posteriormente diseñar los programas tipos (programas pilotos), de control según la situación de cada predio (temporada 2016/17), y en base a ello ***Diseñar finalmente los Programas Premium de Control de Botrytis*** para cada uno de las situaciones de sensibilidad detectadas en los distintos predios, programas que fueron evaluados en la temporada 2017/18.

En los predios modelos la recuperación de aislados de botrytis para análisis y corroboración de niveles de sensibilidad a fenhexamid y boscalid, comenzó en enero de 2016, 2 meses antes del inicio del proyecto, estipulado para Marzo 1 de 2016. En cambio en los predios nuevos se inició en el periodo de flor de la temporada 2016/17.

En paralelo se implementaron las técnicas moleculares (qPCR-Múltiple) para el diagnóstico rápido y efectivo de la presencia de mutaciones asociadas a la pérdida de sensibilidad a los 2 fungicidas, determinándose el tipo y frecuencia de mutaciones presentes en los genes *erg27* y *sdhB* asociadas a resistencia en botrytis a fenhexamid y a boscalid, respectivamente. Además desde mediados de 2017 se iniciaron los trabajos tendientes a optimizar y aumentar aún más la sensibilidad de ambos procesos, incorporándose y validándose el uso de la tecnología HRM (qPCR de alta resolución).

Los resultados generados con las técnicas implementadas y optimizadas señalan algunos cambios en el tipo y frecuencia de mutaciones asociadas con la pérdida de sensibilidad a hydroxianilidas en las poblaciones de Botrytis analizadas; predominando la mutación F412S en un 63,43% de los aislados resistentes analizados. Una muy baja frecuencia presentó la mutación F412V (1,14%), y por primera vez se detecta en las poblaciones de botrytis nacionales y en una frecuencia no menos importante, la mutación F412I (15,18%) (Cuadro 1).

Por otro lado, es importante señalar que a través del tiempo, en general se observa una tendencia a la disminución de aislados sensibles a fenhexamid; de 24,17% aislados

sensibles detectados en precosecha de 2015/16 (aislados silvestres/ no mutantes/ fenilalanina), se llega en precosecha de la última temporada (2017/18) a solo un 12,58% del total de aislados analizados (n=2371) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Frecuencia de mutaciones detectadas en el codón 412 del gen *erg27* y en los codones 225 y 272 del gen *sdhB*, asociadas a resistencia a fenhexamid y a boscalid, por época desde precosecha 2015/16 a precosecha 2017/18. (Resultados se expresan en porcentaje respecto del total de aislados analizados).

F412 Erg27	pre-cosecha 2015-2016	floración 2016-2017	pre-cosecha 2016-2017	floración 2017-2018	pre-cosecha 2017-2018	Total (%)
FENILALANINA*	24,17	22,07	15,45	30,42	12,58	20,24
ISOLEUCINA	25,00	18,62	16,82	3,96	17,08	15,18
LEUCINA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SERINA	48,33	59,31	67,73	60,63	70,34	63,43
VALINA	2,50	0,00	0,00	5,00	0,00	1,14
(n= 2371)	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

P225 SdhB	pre-cosecha 2015-2016	floración 2016-2017	pre-cosecha 2016-2017	floración 2017-2018	pre-cosecha 2017-2018	Total (%)
HISTIDINA	9,17	8,41	32,88	7,08	10,54	15,39
PROLINA*	90,83	91,59	67,12	92,92	89,46	84,61
(n= 2372)	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

H272 SdhB	pre-cosecha 2015-2016	floración 2016-2017	pre-cosecha 2016-2017	floración 2017-2018	pre-cosecha 2017-2018	Total (%)
ARGININA	15,00	28,38	30,15	18,96	57,40	31,75
HISTIDINA*	76,67	66,07	63,48	25,83	26,01	50,21
LEUCINA	0,00	0,60	0,00	0,00	0,00	0,17
TYROSINA	8,33	4,95	6,36	55,21	16,59	17,88
(n=2372)	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

*: corresponden a aislados no mutantes, para fenhexamid (fenilalanina) y para boscalid en codón 225 (prolina) y en 272 (histidina).

En el caso de boscalid las mutaciones más frecuentemente detectadas fueron las presentes en el codón 272, con una proporción de 31,75% del cambio de histidina por asparagina (H272R), un 17,88% del cambio de histidina a tirosina (H272Y), y solo en floración de la temporada 2016/17, y en una bajísima frecuencia (0,6%) el cambio de histidina por leucina (H272L). En la posición 225 solo se detectó en un 15,39% el cambio de prolina por histidina (P225H).

En general, aunque más del 50% de los aislados analizados no presentaron mutaciones, resulta preocupante la disminución de este tipo de aislados en el tiempo (véase Cuadro 1, porcentaje de histidina en H272 en precosecha 2017/18).

En cambio en la posición 225 predominaron los aislados no mutantes, detectándose solo el cambio de prolina por histidina, que alcanzó a través del tiempo valores generalmente bajos, fluctuantes entre un 7 y un 11%, con excepción de la época de precosecha de la temporada 2016/17, en donde los mutantes P225H presentaron una frecuencia mayor al 32% del total de aislados analizados (n=2372), lo cual señala la importancia de realizar este tipo de monitoreos para conocer la capacidad que tienen las poblaciones de botrytis de ir cambiando en el tiempo. Este conocimiento será fundamental para proteger la eficacia y vida útil de las nuevas moléculas carboxamidas que están introduciéndose en el mercado nacional (fluopyram, isofetamida y pydiflumetofen, entre otras).

En el Cuadro 2, se presentan los tipos y frecuencias de las distintas mutaciones v/s los aislados sensibles expresados en porcentaje para fenhexamid y boscalid, por región. Como puede observarse en las tres regiones predominan los aislados mutantes a fenhexamid, correspondiendo a sensibles no mutantes para la posición 412 (fenilalanina) un 23,25%, 18,84% y 20,70% para la V región, región Metropolitana y VI región, respectivamente. Sin embargo, es importante señalar que al considerar a las mutaciones asociadas a pérdida de sensibilidad a boscalid en la V región solo un 6,16% serían sensibles a las dos moléculas. La situación en la región Metropolitana y VI, no es muy diferente, alcanzando los aislados sensibles absolutos a solo un 7,46% y un 11,89%, respectivamente.

Cuadro 2. Tipo y frecuencia de mutaciones asociadas a resistencia a fenhexamid (codón 412: fenilalanina aislados sensibles, mutantes con cambios a serina, valina o isoleucina) y a boscalid (codón 225: prolina silvestre, mutantes con cambio a histidina; codón 272; histidina aislados sensibles, y mutantes con cambio a arginina, leucina o arginina), por Región. (Todos los aislados resistentes marcados con **negrita y cursiva**). Resultados se expresan en porcentaje respecto del total de aislados *B. cinerea* analizados mediante la técnica qPCR múltiple implementada en el proyecto (n=2371).

V Región	ARGININA (272)	HISTIDINA (272)	LEUCINA (272)	TYROSINA (272)	Totales V R
FENILALANINA	12,04%	6,44%	0,00%	4,76%	23,25%
HISTIDINA	0,00%	0,28%	0,00%	0,00%	0,28%
PROLINA	12,04%	6,16%	0,00%	4,76%	22,97%
ISOLEUCINA	6,44%	16,53%	0,00%	1,68%	24,65%
HISTIDINA	0,00%	0,84%	0,00%	0,00%	0,84%
PROLINA	6,44%	15,69%	0,00%	1,68%	23,81%

SERINA	31,37%	12,32%	0,00%	8,12%	51,82%
HISTIDINA	0,00%	1,68%	0,00%	0,00%	1,68%
PROLINA	31,37%	10,64%	0,00%	8,12%	50,14%
VALINA	0,28%	0,00%	0,00%	0,00%	0,28%
HISTIDINA	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
PROLINA	0,28%	0,00%	0,00%	0,00%	0,28%
Totales V Región	50,14%	35,29%	0,00%	14,57%	100,00%

R. Metropolitana	ARGININA (272)	HISTIDINA (272)	LEUCINA (272)	TYROSINA (272)	Totales RM
FENILALANINA (412s)	5,88%	8,68%	0,00%	4,29%	18,84%
HISTIDINA (225r)	0,09%	1,21%	0,00%	0,00%	1,31%
PROLINA (225s)	5,78%	7,46%	0,00%	4,29%	17,54%
ISOLEUCINA (412r)	5,13%	5,41%	0,00%	1,12%	11,66%
HISTIDINA (225r)	0,09%	1,21%	0,00%	0,00%	1,31%
PROLINA (225s)	5,04%	4,20%	0,00%	1,12%	10,35%
SERINA (412r)	15,21%	38,34%	0,37%	13,90%	67,82%
HISTIDINA (225r)	0,09%	18,84%	0,19%	0,00%	19,12%
PROLINA	15,11%	19,50%	0,19%	13,90%	48,69%
VALINA (412r)	0,37%	0,56%	0,00%	0,75%	1,68%
HISTIDINA (225r)	0,00%	0,09%	0,00%	0,00%	0,09%
PROLINA (225s)	0,37%	0,47%	0,00%	0,75%	1,59%
Totales RM	26,59%	52,99%	0,37%	20,06%	100,00%

VI REGIÓN	ARGININA (272r)	HISTIDINA (272s)	LEUCINA	TYROSINA	Totales VI R
FENILALANINA (412s)	2,97%	13,06%	0,00%	4,67%	20,70%
HISTIDINA (225r)	0,00%	1,17%	0,00%	0,00%	1,17%
PROLINA (225s)	2,97%	11,89%	0,00%	4,67%	19,53%
ISOLEUCINA (412r)	6,90%	6,37%	0,00%	2,34%	15,61%
HISTIDINA (225r)	0,00%	2,23%	0,00%	0,00%	2,23%
PROLINA	6,90%	4,14%	0,00%	2,34%	13,38%
SERINA (412r)	20,81%	33,23%	0,00%	8,81%	62,85%
HISTIDINA (225r)	0,00%	9,45%	0,00%	0,00%	9,45%
PROLINA (225s)	20,81%	23,78%	0,00%	8,81%	53,40%
VALINA (412r)	0,00%	0,00%	0,00%	0,85%	0,85%
HISTIDINA (225r)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
PROLINA (225s)	0,00%	0,00%	0,00%	0,85%	0,85%
Totales VI R	30,68%	52,65%	0,00%	16,67%	100,00%

Por otro lado, si analizamos los cambios en la frecuencia del tipo de mutaciones a través del tiempo, desde precosecha 2015/16 a precosecha 2017/18 (Cuadro 3), se reitera lo ya indicado, respecto de disminución gradual de los aislados sensibles desde previo al inicio del proyecto (precosecha 2015/16) a precosecha de la temporada 2017/18, última época evaluada. En el caso de fenhexamid el porcentaje de aislados sensibles no mutantes a fenhexamid (fenilalanina) de 24,17% en precosecha de 2015/16 disminuyen a solo un 12,58% en la misma época de la temporada 2017/18. Y los mutantes valina (F412V), se detectaron en una muy baja frecuencia (2,5%) solo en la primera época de evaluación (precosecha 2015/16).

En cambio, los aislados no mutantes a boscalid de un 67,5% en precosecha 2015/16 (76,67% histidina codón 272 - 9,17% de mutantes en codón 225) llegan a solo un 15,28% al término del estudio (25,84% en codón 272 menos 10,56% mutantes histidina en codón 225).

Los mutantes H272L, que corresponden al cambio de histidina por leucina solo se detectaron en la época de floración de la temporada 2016/17, y en una muy baja frecuencia, lo cual es importante porque este tipo de aislado se comporta moderadamente resistente a fluopyram, y por lo tanto un mayor porcentaje y prevalencia de este tipo de aislados podría afectar la eficacia de ésta molécula fungicida recientemente incorporada en los programas de control de botrytis en Chile.

Cuadro 3. Distribución a través del tiempo del Tipo y frecuencia de mutaciones asociadas a la pérdida de sensibilidad a fenhexamid (isoleucina, serina y valina) y boscalid (arginina, leucina y tirosina en código 272, y de Histidina en código 225), en aislados de *B. cinerea* recuperados en precosecha de 2015/16, 2016/17 y de 2017/18 (Totales generales por época). (Aislados sensibles no mutantes en letra cursiva).

Distribución (%) de aislados de <i>B. cinerea</i> sensibles v/s mutantes resistentes en pre-cosecha 2015-2016				
	ARGININA (H272R)	HISTIDINA (H272)	TYROSINA (H272Y)	Totales F412
<i>FENILALANINA (F412)</i>	12,50%	10,83%	0,83%	24,17%
<i>PROLINA (P225)</i>	12,50%	10,83%	0,83%	24,17%
HISTIDINA (P225H)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
ISOLEUCINA (F412I)	0,83%	24,17%	0,00%	25,00%
<i>PROLINA (P225)</i>	0,83%	24,17%	0,00%	25,00%
HISTIDINA (P225H)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
SERINA (F412S)	1,67%	39,17%	7,50%	48,33%
<i>PROLINA (P225)</i>	1,67%	30,00%	7,50%	39,17%
HISTIDINA (P225H)	0,00%	9,17%	0,00%	9,17%
VALINA (F412V)	0,00%	2,50%	0,00%	2,50%
<i>PROLINA (P225)</i>	0,00%	2,50%	0,00%	2,50%
HISTIDINA (P225H)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Totales H272	15,00%	76,67%	8,33%	100,00%
Distribución (%) de aislados de <i>B. cinerea</i> sensibles v/s mutantes resistentes en pre-cosecha 2016-2017				
	ARGININA (H272R)	HISTIDINA (H272)	TYROSINA (H272Y)	Totales F412
FENILALANINA (F412)	6,97%	6,97%	1,52%	15,45%
PROLINA (P225)	6,97%	4,85%	1,52%	13,33%
HISTIDINA (P225H)	0,00%	2,12%	0,00%	2,12%
ISOLEUCINA (F412I)	7,27%	6,21%	3,33%	16,82%
PROLINA (P225)	7,27%	4,24%	3,33%	14,85%
HISTIDINA (P225H)	0,00%	1,97%	0,00%	1,97%
SERINA (F412S)	15,91%	50,30%	1,52%	67,73%
PROLINA (P225)	15,76%	21,67%	1,52%	38,94%
HISTIDINA (P225H)	0,15%	28,64%	0,00%	28,79%
VALINA (F412V)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
PROLINA (P225)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
HISTIDINA (P225H)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Totales H272	30,15%	63,48%	6,36%	100,00%

Aislados sensibles para fenhexamid: F412; Aislados sensibles para boscalid en codón 225: P225, y en codón 272: H272.

Distribución (%) de aislados de <i>B. cinerea</i> sensibles v/s mutantes resistentes en pre-cosecha 2017-2018				
	ARGININA (H272R)	HISTIDINA (H272)	TYROSINA (H272Y)	Totales F412
FENILALANINA (F412)	3,15%	8,54%	0,90%	12,58%
PROLINA (P225)	3,15%	8,09%	0,90%	12,13%
HISTIDINA (P225H)	0,00%	0,45%	0,00%	0,45%
ISOLEUCINA (F412I)	11,46%	3,37%	2,25%	17,08%
PROLINA (P225)	11,46%	2,25%	2,25%	15,96%
HISTIDINA (P225H)	0,00%	1,12%	0,00%	1,12%
SERINA (F412S)	42,92%	13,93%	13,48%	70,34%
PROLINA (P225)	42,92%	4,94%	13,48%	61,35%
HISTIDINA (P225H)	0,00%	8,99%	0,00%	8,99%
VALINA (F412V)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
PROLINA (P225)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
HISTIDINA (P225H)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Totales H272	57,53%	25,84%	16,63%	100,00%

Aislados sensibles para fenhexamid: F412; Aislados sensibles para boscalid en codón 225: P225, y en codón 272: H272.

Los resultados obtenidos a través de las técnicas moleculares implementadas como el de las optimizadas, fueron comparados con los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos de sensibilidad *in vitro* a estas dos moléculas, realizándose además pruebas de sensibilidad a la mezcla cyprodinil & fludioxonil, que actualmente sigue siendo la de mayor eficacia en el control de Botrytis; a fenpyrazamine, molécula perteneciente a la familia de las amino-pyrazolinonas que presenta el mismo sitio de acción que fenhexamid; a fluopyram e isofetamida, que corresponden a las 2 primeras nuevas moléculas de última generación del grupo de las carboxamidas, que también forman parte de las moléculas de alta eficiencia y que serán la base del control de esta importante enfermedad a partir de la temporada 2018/19. Además, se incluyó a fludioxonil, molécula que forma parte de la mezcla Switch, y que recientemente también ha sido formulada en mezcla con fenhexamid.

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 1. a-g, en ésta puede observarse una predominancia de aislados resistentes a fenhexamid en todas las épocas analizadas, con promedios de valores EC_{50} muy superiores al punto de corte establecido (2-4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los valores EC_{50} mínimos máximos y mediana detectado para cada molécula en cada una de las épocas evaluadas se presentan en el Anexo 1.

Situación similar se observa en los valores EC_{50} de fenpyrazamine, en el que se asumieron como punto de corte los mismos valores, sin embargo, según estudios realizados (2), el valor que está siendo considerado actualmente sería muy superior a éstos ($EC_{50} > 50 \mu\text{g}/\text{mL}$). No obstante lo anterior, los valores detectados en los análisis realizados en este proyecto, superarían en la mayoría de las épocas analizadas este valor manteniéndose por lo tanto la predominancia de aislados resistentes a fenpyrazamine en los aislados de *B. cinerea* chilenos.

En el caso de los valores EC_{50} detectados en los aislados a boscalid, la situación no es muy diferente; predominan los aislados resistentes por sobre los sensibles y en la última época evaluada (precosecha temporada 2017/18), el 86,8 % de los aislados presentó un EC_{50} promedio de 86 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En el caso de las nuevas moléculas carboxamidas, fluopyram e isofetamida, la situación de sensibilidad sigue siendo preocupante, porque, aunque predominan los aislados sensibles por sobre los resistentes, la frecuencia de estos últimos en una población recientemente sometida a fluopyram (registro para uso en uva de mesa solo desde floración 2017/18), es alta (31,31%) (Figura 1, sección d).

El comportamiento hacia isofetamida (Figura 1, sección e), perteneciente al mismo grupo, con registro obtenido recién este año, y que será utilizada a partir de la temporada 2018/19, es aún más preocupante porque los aislados resistentes de precosecha de la temporada 2017/18 superan el 46% del total de aislados analizados.

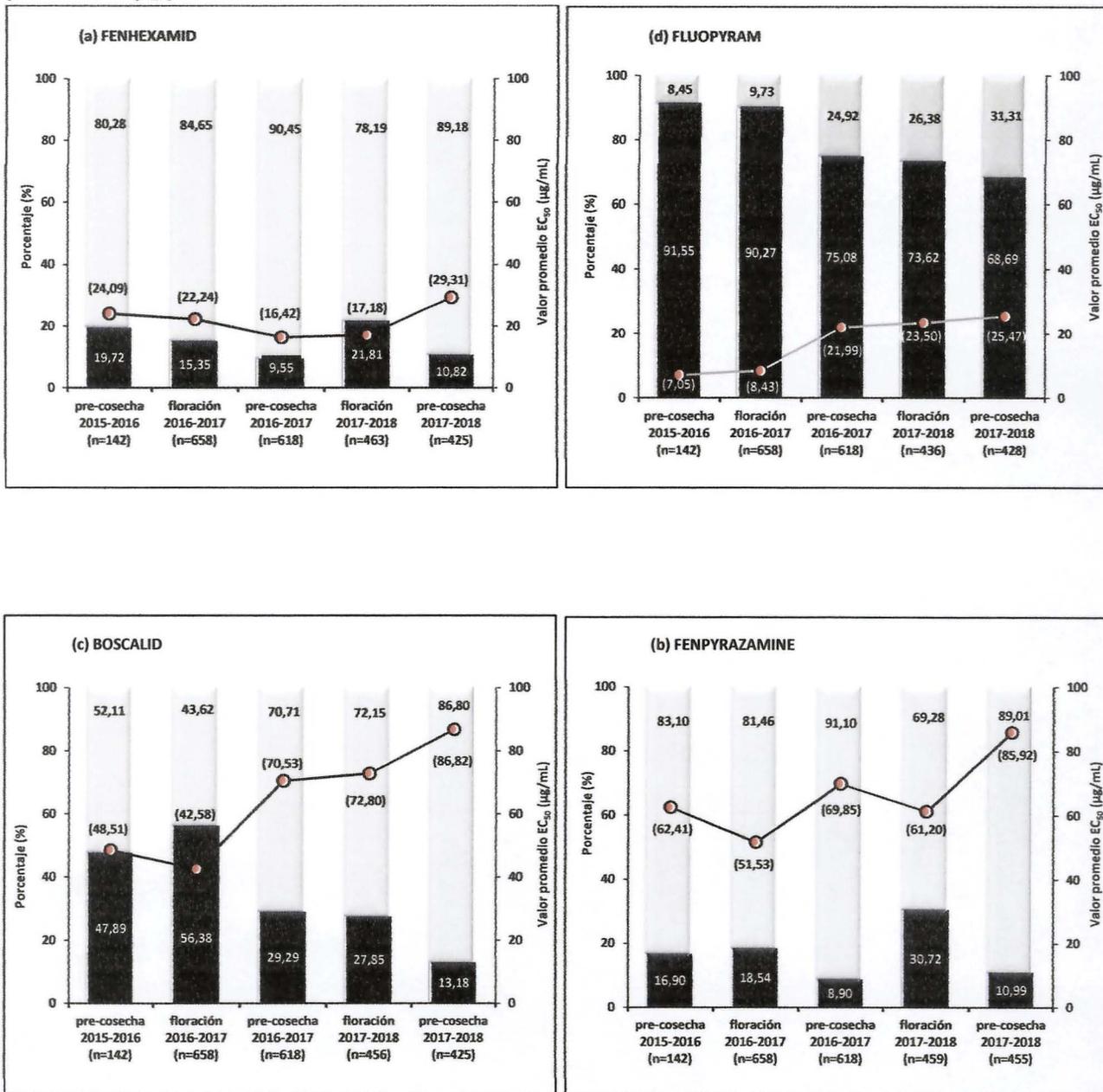
El comportamiento detectado a estas dos nuevas carboxamidas en modo alguno puede indicar que no sean de alta eficiencia, si no, más bien a la pre-existencia de un cierto nivel de resistencia cruzada positiva como consecuencia de un uso inadecuado de boscalid en temporadas anteriores.

Por otro lado, es importante destacar que según los resultados obtenidos en este proyecto y ya indicados, existe un alto riesgo de que se incremente la pérdida de sensibilidad a fluopyram e isofetamida a través del tiempo si no se utilizan en forma adecuada, porque si bien los valores EC_{50} promedios detectados son bajos, se detecta una tendencia al incremento en éstos, presentando algunos de los aislados analizados EC_{50} cercanos a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

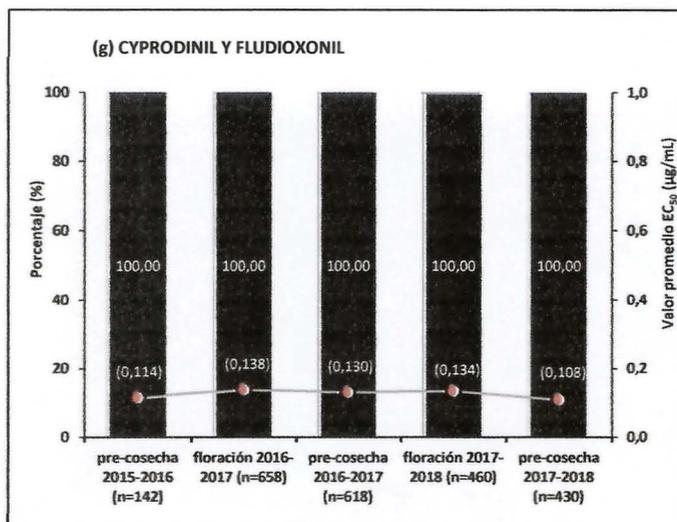
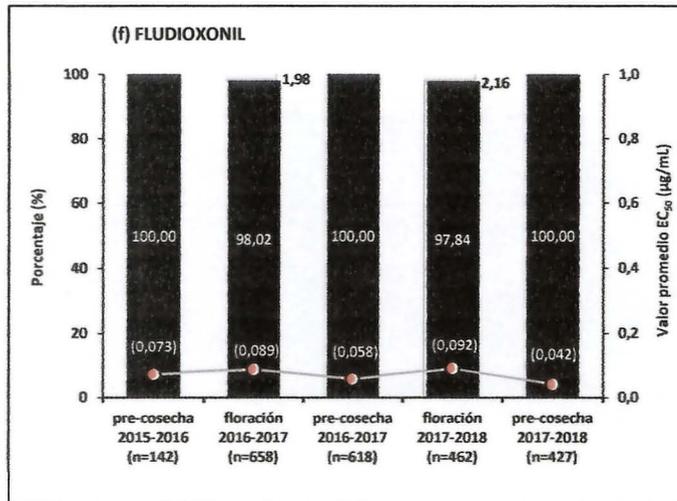
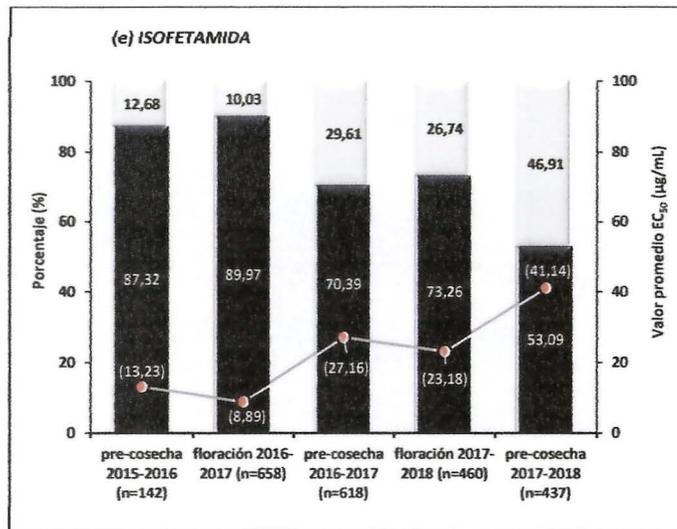
Los antecedentes antes mencionados señalan la importancia de difundir aún más los resultados obtenidos en esta iniciativa con el fin de impulsar la práctica del monitoreo de los cambios en sensibilidad mediante la detección del tipo y frecuencia de las mutaciones asociadas a resistencia a carboxamidas mediante la herramienta molecular de diagnóstico implementada en esta iniciativa, con el fin de evitar la pérdida de sensibilidad a estas nuevas moléculas botryticidas de alta eficiencia que recién se están incorporando en los programas de control de botrytis en uva de mesa en el país (fluopyram/2017/2018; isofetamida/2018/19). Debido a lo anterior debería considerarse como una práctica de uso común y fundamental el monitoreo con esta herramienta, al menos por las empresas de agroquímicas involucradas, como forma de proteger a sus activos.

Finalmente, y como se puede observar en las gráficas f y g de la Figura 1, en todas las épocas evaluadas un porcentaje cercano al 100% de los aislados analizados se presentó con alta sensibilidad a fludioxonil como para la mezcla cyprodinil & fludioxonil con valores EC_{50} muy inferiores al punto de corte establecido (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), con la excepción de un 1,98 y 2,16% de aislados recuperados desde flor de las temporadas 2016/17 y 2017/18, respectivamente que presentaron valores EC_{50} mayores al punto de corte, aislados resistentes a fludioxonil pero que se comportaron como sensibles a la mezcla.

Figura 1. Porcentajes de aislados sensibles (●) v/s resistentes (○) por época analizada en cada temporada, para cada una de las moléculas fungicidas solas o en mezclas evaluadas: (a) fenhexamid, (b) fenpyrazamine, (c) boscalid, (d) fluopyram, (e) isofetamida, (f) fludioxonil y (g) cyprodinil & fludioxonil. Valores EC₅₀ promedio totales para cada una de éstas y por época en paréntesis (○).



Continuación Figura 1,



Otro resultado importante es que a través del tiempo se corroboró que las poblaciones de botrytis son muy dinámicas y que éstas reaccionan rápidamente frente al manejo agroecológico al que son sometidas. Ejemplo de ello es que en una misma temporada fue posible detectar cambios a nivel de mutaciones frente a cambios en el programa de control al incorporarse entre las aplicaciones de los fungicidas de alta eficiencia algunas de las moléculas alternativas no residuales involucradas en el proyecto (Anexo 2).

También y en paralelo a las actividades ya indicadas, se realizó la evaluación del efecto de los antagonistas biológicos y fungicidas no residuales del género *Bacillus* (Serenade ASO y Serifel) y del extracto de la planta del Té (*Melaleuca alternifolia*), éstas pruebas se realizaron mediante Bio-ensayos en plántulas de pepino, bajo condiciones controladas. Resultados obtenidos se presentan en Anexo 3.

En base a todos los resultados generados se seleccionaron algunos de los tratamientos tipo que se sometieron a evaluación durante la temporada 2016/17 en los predios modelos, y se diseñaron 3 a 4 tratamientos Premium para los 10 predios asociados al proyecto (5 modelos y los 5 predios nuevos), los que fueron evaluados en 2017/18, última temporada del proyecto. Estos tratamientos consideraron los resultados de todos los parámetros evaluados (niveles de infección, niveles de pudrición en poscosecha, niveles de sensibilidad con técnicas tradicionales y con las técnicas moleculares implementadas).

Los resultados obtenidos en los tratamientos Premium permitieron seleccionar para cada uno de los predios, los que se comportaron como las alternativas más eficientes de control, respecto de: incremento de aislados sensibles, disminución de mutaciones y menores niveles de pudrición en poscosecha (Anexo 4).

Según estos últimos resultados se corrobora la importancia de diseñar programas según condición de sensibilidad y tipo y frecuencia de mutación asociada de cada predio, porque tratamientos idénticos en distintos predios otorgan distinto resultado final.

También es importante señalar que como el uso de la técnica molecular implementada será la herramienta tecnológica base para diseñar programas de control más eficaces porque considera la realidad particular de las poblaciones de *Botrytis* predominantes a nivel predial, será también esperable que los predios que utilicen en el futuro este tipo de análisis obtengan un resultado productivo y económico más exitoso, lo que se traducirá en fruta más sana y con menos residuos y en mejores retornos a nivel productor, y por ende a nivel país.

Este plus a generarse financiará el costo adicional involucrado en el uso de esta nueva herramienta de innovación, porque al hacer el ejercicio de posibles valores de los nuevos análisis, el costo final es inferior al inicial sin el uso de esta herramienta (Cuadro 4), por lo que con el tiempo es muy probable que se considere como una práctica más dentro de las habituales en el manejo de botrytis en el cultivo de la Uva de mesa de Exportación como en otros cultivos de importancia económica para el país, **optimizándose la producción de éstos a nivel regional y a nivel país.**

Cuadro 4. Comparación de costos de los análisis moleculares tradicionales y análisis moleculares desarrollados en el proyecto

a) COSTOS POR AISLADO DE BOTRYTIS CINEREA 1 SONDA CON SECUENCIACIÓN	\$ 48.000
b) COSTOS POR AISLADO DE BOTRYTIS CINEREA 1 SONDA SIN SECUENCIACIÓN	\$ 24.000 *
c) COSTOS POR AISLADO DE BOTRYTIS CINEREA 3 SONDAS CON SECUENCIACIÓN	\$ 62.000
d) COSTOS POR AISLADO DE BOTRYTIS CINEREA 3 SONDAS SIN SECUENCIACIÓN	\$ 34.000
Carboxamidas	
a) COSTOS POR AISLADO DE BOTRYTIS CINEREA 1 SONDA CON SECUENCIACIÓN	\$ 48.000
b) COSTOS POR AISLADO DE BOTRYTIS CINEREA 1 SONDA SIN SECUENCIACIÓN	\$ 24.000 *
c) COSTOS POR AISLADO DE BOTRYTIS CINEREA 5 SONDAS CON SECUENCIACIÓN	\$ 65.000
d) COSTOS POR AISLADO DE BOTRYTIS CINEREA 5 SONDAS SIN SECUENCIACIÓN	\$ 42.000

Finalmente, es importante señalar que todos los resultados generados durante las tres temporadas de trabajo de esta iniciativa FIA fueron dados a conocer directamente a los productores involucrados. La difusión a la comunidad interesada externa al proyecto se realizó informando los resultados más generales y globales, manteniéndose de esta forma el nivel de confidencialidad de la data de cada predio.

2. Cumplimiento de los objetivos del proyecto:

- **Descripción breve de los resultados ESPERADOS VERSUS LOS OBTENIDOS, comparación con los objetivos planteados, y razones que explican las discrepancias (ANÁLISIS DE BRECHA)**

Objetivo 1. Desarrollar e implementar una herramienta molecular de detección temprana de pérdida de sensibilidad a Carboxamidas (qPCR-Múltiple-FMCA), en base a la detección de mutaciones que confieren resistencia a Carboxamidas en *Botrytis cinerea*.

Este objetivo se cumplió totalmente, ya que se desarrolló e implementó la herramienta de detección temprana de pérdida de sensibilidad a Carboxamidas, que permite detectar las mutaciones en el gen *SDHB* en aislados de *Botrytis cinerea*, en un solo paso, una sonda y partidores para varias mutaciones. De esta manera se pudo determinar el tipo y frecuencia de mutación en las posiciones 272 (H272R/Y/I) y 225 (P225H) en una sola reacción (Figura 2).

Objetivo 2. Optimizar una herramienta de qPCR para la detección de mutaciones que confieren resistencia a hydroxylanilidas (qPCR-FMCA) en *Botrytis cinerea*.

Este objetivo se cumplió totalmente, ya que se optimizó la herramienta de qPCR implementada previamente en Proyecto InnovaChile de CORFO, en donde para detectar cada mutación asociada al gen *Erg27* en el codón 412, que se asocian a alta resistencia a hydroxylanilidas, era necesario el uso de sondas y partidores distintos. La optimización de la técnica permite actualmente detectar en una reacción con una única sonda y partidores, las tres mutaciones asociadas (cambio de fenilalanina por serina (F412S), o por isoleucina (F412I) o por valina (F412V). De esta manera se pudo establecer el tipo y frecuencia de cada mutación en la población de aislados recuperados desde los distintos predios en los periodos de flor y precosecha de 2 temporadas consecutivas (2016/17 y 2017/18). Lo mismo se realizó en el caso de las mutaciones asociadas a pérdida de sensibilidad a carboxamidas (Figura 2).

Objetivo 3. Determinar nivel de sensibilidad a fungicidas del tipo carboxamidas e hydroxylanilidas mediante las herramientas de innovación y validar presencia e incidencia de mutaciones mediante secuenciación y análisis microbiológicos tradicionales de sensibilidad e infección con muestras obtenidas desde los predios seleccionados. Lo mismo se realizó en el caso de las mutaciones asociadas a pérdida de sensibilidad a carboxamidas. (Véase anexo 1: Tipo y frecuencia de mutaciones asociadas a hydroxylanilidas y carboxamidas).

Este objetivo se cumplió totalmente, determinándose el nivel de sensibilidad mediante la detección de mutaciones asociadas a resistencia a Hydroxylanilidas y Carboxamidas presentes en los genes *Erg27* y *SDHB*, respectivamente, coincidiendo en la mayoría de los casos en un 100% con los resultados obtenidos en la secuenciación y los análisis microbiológicos tradicionales. Sin embargo es importante señalar que en algunos pocos aislados que presentaban valores EC_{50} para boscalid superiores al punto de corte ($15\mu\text{g/mL}$), no presentaban mutaciones en la sub unidad B de la enzima succinato deshidrogenasa, tanto bajo la técnica implementada como bajo secuenciación. Similar resultado se presentó en muy pocos aislados en el caso de las determinaciones realizadas a fenhexamid ($\text{punto de corte/ } EC_{50} = 2\mu\text{g/mL}$) (Anexo 1).

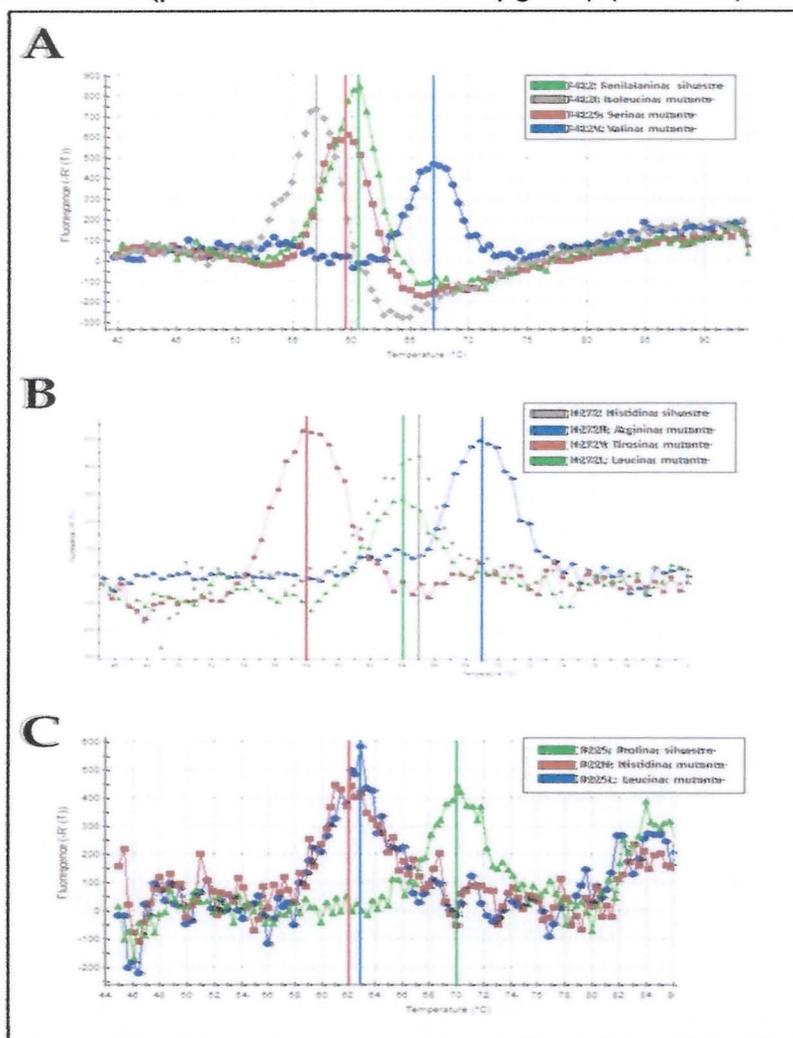


Figura 2.- Identificación de mutaciones en *erg27* y *sdhB* de *Botrytis cinerea* mediante FMCA (Fluorescence melting Curve Analysis). Se muestra en A curvas de melting representativas indicando distintos cambios en el codón 412 de *erg27* a través de la sonda marcada con CY5. En B y C se presentan curvas características para los distintos cambios identificados en el codón 225 y 272 de *sdhB*, a través de las sondas marcadas con HEX y FAM, respectivamente.

En todos los casos las líneas verticales indican la temperatura de melting característica a cada curva.

Objetivo 4. Evaluar en aislados de distinto nivel de sensibilidad a los fungicidas del tipo carboxamidas e hydroxianilidas, la efectividad de moléculas alternativas medioambientalmente amigables para el control de *Botrytis* y el nivel de sensibilidad a los fungicidas químicos para el diseño de Programas de control piloto.

Este objetivo se cumplió totalmente, ya que se evaluaron los aislados de *Botrytis cinerea* categorizados según nivel de sensibilidad a fenhexamid y boscalid con respecto a fungicidas no residuales y antagonistas biológicos, lo que permitió diseñar programas de control sustentables según la condición de sensibilidad presente en cada predio analizado (Anexo 3).

Objetivo 5. Selección de Programas Premium de Control de *Botrytis cinerea* evaluando la eficacia de los programas de control piloto aplicados (Temporada 2) en los predios seleccionados, mediante la determinación de los niveles de infección de *Botrytis* y el nivel de pérdida de sensibilidad (resistencia) a los fungicidas, utilizando las herramientas de innovación.

Según los resultados de sensibilidad obtenidos en los predios sometidos a los distintos programas fitosanitarios durante las temporadas 2015-2016 y 2016-2017, se seleccionaron los tratamientos más efectivos en el control de *Botrytis cinerea*, los que al ser aplicados en la temporada 2017-2018 resultaron ser en la mayoría de los casos los más eficaces (Anexo 4). Al respecto es importante señalar que en algunos de los predios el tratamiento tradicional presentó menores porcentajes de pudrición en poscosecha, pero este resultado fue consecuencia de un programa muy intensivo diseñado por el productor y por lo tanto no puede compararse con los tratamientos propuestos por el proyecto, porque por el alto número de aplicaciones no es sustentable medioambientalmente, lo cual es un factor de importancia que debe considerarse para protección de la industria de la uva de mesa de exportación.

Objetivo 6. Difundir los resultados del proyecto a beneficiarios finales de las zonas productoras (Región Metropolitana y, V y VI Regiones).

Este objetivo se cumplió totalmente, ya que en el transcurso de todo el proyecto se realizaron charlas informativas, talleres técnicos y seminarios enfocados a entregar la información a los productores de las zonas más importantes en la producción de uva de mesa en Chile.

- **Descripción breve de los impactos obtenidos**

1. Se corrobora la importancia de realizar monitoreos de infección y sensibilidad en la uva de mesa de exportación para lograr un control eficiente de *Botrytis* de manera sustentable (fruta más sana / menores pérdidas por pudrición / menores residuos = mayor precio).
2. La protección de las moléculas botryticidas de alta eficiencia es un compromiso no solo de las empresas de agroquímicos, si no, que también de todos los usuarios e involucrados con el sistema de producción de una de mesa. Como hemos mencionado anteriormente una inadecuada aplicación de fungicidas puede limitar su uso por la generación de aislados resistentes implicando pérdidas económicas importantes en el sector.
3. Las moléculas alternativas no residuales son complementarias al uso de los fungicidas químicos, controlando algunos aislados resistentes y devolviendo la sensibilidad en algunos casos a las moléculas químicas.
4. Si se diseñan programas de control según los antecedentes de sensibilidad del predio se obtienen mejores resultados en el control de *Botrytis cinerea*.
5. La herramienta de innovación desarrollada e implementada es capaz de manera rápida y confiable detectar las mutaciones asociadas a resistencia, además de ser más económica que la herramienta molecular convencional

3. **Aspectos metodológicos del proyecto:**

- Descripción de la metodología efectivamente utilizada

Método objetivo 1: Desarrollar e implementar una herramienta molecular de detección temprana de pérdida de sensibilidad a Carboxamidas (qPCR-Múltiple-FMCA), en base a la detección de mutaciones que confieren resistencia a Carboxamidas en *Botrytis cinerea*.

Desarrollo e implementación de la Técnica:

Se utilizó la técnica de qPCR con sondas TaqMan® y análisis de fluorescencia de la curva de disociación (Fluorescence Melting Curve Analysis, FMCA) (Huang et al., 2011) para la detección de mutaciones en carboxamidas. Se diseñaron 2 sondas TaqMan® específicas, una para cada posición del gen (225 y 272 del gen *sdhB*), cada una con distintos fluoróforos para realizar la detección en una única reacción. Estas sondas diferenciaron las distintas mutaciones o aislados sin mutación, por diferencias en el perfil de la curva de disociación.

Las mutaciones detectadas en aislados resistentes a carboxamidas (boscalid), en Chile y para las cuales se diseñaron las sondas fueron: H272R, H272Y, H272L, P225L y P225H.

El diseño de las sondas fue realizado utilizando secuencias de aislados con presencia de mutaciones y la secuencia de referencia.

Los pasos a seguir para la implementación de esta metodología fueron:

- *Alineamientos de las secuencias nucleotídicas del gen sdhB de los aislados resistentes y sensibles para la identificación de las mutaciones asociadas a la resistencia a Carboxamidas utilizando secuencias del gen sdhB obtenidos previamente y que forman parte del cepario del Laboratorio de Fitopatología Frutal y Molecular de la Universidad de Chile y del banco de genes (NCBI).*

En base al alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen sdhB se diseñaron 2 sondas (una para cada posición 225 y 272 del gen sdhB) y partidores específicos para las mutaciones detectadas previamente en Chile y las de posibles nuevas mutaciones. Cada sonda fue marcada con un fluoróforo distinto (ROX, CY5, HEX o FAM).

- *Evaluación de la especificidad y eficiencia de las sondas utilizando muestras-aislados-controles conocidas, previamente caracterizados como aislados de *Botrytis cinerea* resistentes y sensibles a Carboxamidas.*

Con este propósito se realizaron las siguientes pruebas para optimizar e implementar la técnica:

- *Realización de curva estándar para el cálculo de eficiencia de los partidores,*
- *Prueba de ajuste de concentración de partidores y sondas,*
- *Prueba de las sondas para ajuste de perfil térmico,*
- *Prueba de cada sonda por separado para verificar amplificación,*
- *Prueba en una reacción como multiplex y finalmente se realizó la validación de la detección de mutaciones corroborando mediante secuenciación de los aislados previamente categorizados respecto de las mutaciones de la posición 225 y 272, previamente descritas por el Laboratorio de Fitopatología Frutal y Molecular de la Universidad de Chile y corroboradas mediante secuenciación en MACROGEN USA.*

Método objetivo 2: *Optimizar una herramienta de qPCR para la detección de mutaciones que confieren resistencia a hydroxylanilidas (qPCR-FMCA) en *Botrytis cinerea*.*

Anterior a este proyecto, se disponía de la técnica para la detección de mutaciones asociadas a distintos niveles de sensibilidad a fenhexamid, desarrollada dentro del

Proyecto Innova-Chile de CORFO (Código Innova: 11BPC-9947), por el Laboratorio de Fitopatología Frutal y Molecular de la Universidad de Chile. Esta técnica que también utiliza qPCR, consistía en detectar cada una de las mutaciones utilizando una sonda específica marcada con un fluoróforo (FAM: sensible; HEX: mutación serina; CY5: mutación valina y ROX: mutación isoleucina). En este proyecto, el objetivo fue optimizar la técnica ya desarrollada, realizando la detección de las 3 mutaciones presentes en el codón 412 de gen Erg 27 y la presencia de aislados sensibles, utilizando una única sonda en vez de cuatro.

La optimización se realizó siguiendo los mismos pasos mencionados anteriormente: prueba de ajuste de concentración de partidores y sondas, prueba de las sondas para ajuste de perfil térmico, y la validación de la detección de mutaciones corroborando con secuenciación de los aislados previamente descritos.

Método objetivo 3: Determinar el nivel de sensibilidad a fungicidas del tipo carboxamidas e hydroxianilidas mediante la herramienta de innovación y validar presencia e incidencia mediante secuenciación y análisis microbiológicos tradicionales de sensibilidad e infección con muestras obtenidas desde los predios seleccionados.

Determinación de la presencia de mutaciones asociadas a resistencia a carboxamidas e hydroxianilidas utilizando la herramienta de innovación de qPCR desarrollada.

Las muestras fueron colectadas desde 6 predios (los 5 predios tipo base de distinta condición inicial de sensibilidad a carboxamidas e hydroxianilidas, y uno de éstos en la primera temporada bajo dos condiciones: con y sin cobertura), y desde los otros 5 predios asociados (pequeños, medianos y grandes).

La determinación se realizó sobre aislados obtenidos desde predios tipo base

- **Temporada 0 (2015-2016):** precosecha, 24 aislados por predio= 144 aislados más aislados controles= 157 aislados (la recuperación de estos aislados se realizó previo al inicio oficial del proyecto / enero – febrero 2016)

- **Temporada 1 (2016/17):** floración y precosecha= (12 aislados* 5 predios* 10 tratamientos * 2 estadios) + (18 aislados * 5 predios* 2 estadios) = 1380 aislados.

Evaluación de tratamientos y en base a resultados de sensibilidad, mutaciones, niveles de infección y pudrición final en poscosecha se diseñaron los programas óptimos según condición de sensibilidad de los predios modelos seleccionados (5 predios).

- **Temporada 2 (2017/18):** floración y precosecha = 12 aislados* 10 predios* 2 estadios* 4 programas aplicados= 960 aislados.

Luego del rescate de aislados monospóricos y extracción de ADN, se realizó el protocolo diseñado para el funcionamiento de la herramienta de innovación para la *detección de mutaciones*.

Para corroborar la presencia de las mutaciones detectadas a través de las herramientas de innovación desarrolladas, todos los aislados obtenidos en la temporada 1 (2016/17) fueron secuenciados y en la temporada 2 (2017/18) un porcentaje menor de estos fueron validados mediante *secuenciación*.

Corroboración de sensibilidad a fungicidas a través de análisis microbiológicos tradicionales (*in vitro*):

Para validar el resultado de la técnica implementada respecto del tipo y frecuencia de mutaciones detectadas en el total de aislados de *Botrytis* analizados se determinó el nivel de sensibilidad a carboxamidas e hydroxianilidas a través de las técnicas tradicionales:

Con los resultados obtenidos, se pudo determinar el porcentaje de correspondencia entre la presencia de mutación y el nivel de resistencia a carboxamidas y/o detección por secuenciación.

Esta técnica estará disponible para la realización de análisis de sensibilidad a este grupo de fungicidas y mutaciones asociadas en poblaciones de *Botrytis* para los productores de uva de mesa y de otros cultivos en que también *Botrytis* es un gran problema.

Determinación de niveles de sensibilidad:

- Colecta y recuperación de aislados del hongo desde los distintos predios en estudio.
- *Obtención de aislados monospóricos en Agar Malta, incremento (en PDA o Agar Malta levadura) y respaldo en criotubos con glicerol al 20%.*
- *Evaluación sensibilidad a fenhexamid y a fenpyrazamine: Mediante pruebas de Crecimiento Miceliar y Elongación de Tubo Germinativo en medio Sisler y Glucosa-Fosfato.*
- *Evaluación de sensibilidad a boscalid, fluopyram e isofetamida: Mediante pruebas de Germinación Conidial y Elongación del Tubo Germinativo en medio Agar-Agua.*
- *Evaluación de sensibilidad a cyprodinil&fludioxonil: Mediante pruebas de Crecimiento Miceliar en medio Sisler.*
- *Evaluación de sensibilidad fludioxonil: Mediante pruebas de Crecimiento Miceliar en medio Sisler.*

Método objetivo 4: Evaluar en aislados de distinto nivel de sensibilidad a los fungicidas del tipo carboxamidas e hydroxianilidas, la efectividad de moléculas alternativas medioambientalmente amigables para el control de *Botrytis* y el nivel de sensibilidad a los fungicidas químicos para el diseño de Programas de control piloto.

Determinación de efectividad de moléculas alternativas no residuales en Bio-ensayos de virulencia

Se realizó con el fin de evaluar la acción fungicida y/ o fungistática de las moléculas alternativas sobre aislados de distinto nivel de sensibilidad a boscalid y fenhexamid. Las moléculas alternativas no residuales evaluadas fueron: (antagonistas biológicos (*Trichoderma* spp. (*Trichonativa*), *Bacillus subtilis* (*Serenade*), *Bacillus amyloliquefaciens* MBI 600 (*Serifel*), y extracto de planta (*Melaleuca alternifolia* (*Timorex Gold*)).

El procedimiento consistió en lo siguiente:

- Siembra de semillas de pepino (*Cucumis sativus*) en almacigueras y posterior trasplante a contenedores
- Incremento de aislados de distinto nivel de sensibilidad a ambos fungicidas
- Inoculación con aislados de *Botrytis* en el primer par de hojas verdaderas en pre y post-aplicación de las moléculas alternativas no residuales.
- Incubación de plántulas bajo condiciones de temperatura, luz y porcentaje de humedad controladas.
- Evaluación de efecto mediante medición del diámetro de lesión (mm).

Diseño, aplicación y evaluación en terreno de programas pilotos de control de *Botrytis*:

De acuerdo a los resultados obtenidos de efectividad de moléculas alternativas no residuales y los resultados de niveles de sensibilidad a fungicidas químicos, fueron diseñados los programas pilotos de control de *Botrytis*, incorporando moléculas alternativas no residuales y/o reemplazando fungicidas según condición de sensibilidad presentada:

- Diseño de programas para condición de predio con alta resistencia a fenhexamid
- Diseño de programas para condición de predio con alta resistencia a boscalid
- Diseño de programas para condición de predio con alta resistencia a fenhexamid y a boscalid
- Diseño de programas para condición de predio con predominio de aislados sensibles a las dos moléculas.

Evaluaciones: niveles de infección en floración y precosecha, niveles de sensibilidad según técnicas tradicionales y qPCR.

Evaluación de nivel de pudrición en post cosecha, luego de simulación de almacenamiento refrigerado.

Método objetivo 5: Selección de Programas Premium de Control de *Botrytis cinerea* evaluando la eficacia de los programas de control piloto aplicados (Temporada 2) en los predios seleccionados, mediante la determinación de los niveles de infección de *Botrytis* y la resistencia a fungicidas utilizando las herramientas de innovación.

De acuerdo a los resultados obtenidos de los programas pilotos de control de *Botrytis* se realizó la selección de los programas Premium de control.

La evaluación de los programas pilotos se realizó utilizando las herramientas de innovación implementadas (determinación de tipo y frecuencia de mutaciones asociadas a resistencia a carboxamidas e hydroxianilidas) y analizando los niveles de infección que aportarían el dato de incidencia de la enfermedad.

Fueron seleccionados 3 o 4 programas Premium de control de *Botrytis cinerea* según predio analizado.

Una vez realizada la evaluación de resultados de los programas Premium, fueron sugeridos programas de control óptimo en todos los predios.

Evaluaciones:

- Evaluaciones de niveles de infección en cada predio.
- Análisis de aislados obtenidos utilizando técnicas de qPCR implementadas (detección de tipo y frecuencia de mutaciones en las poblaciones recuperadas).
- Evaluación de nivel de pudrición en poscosecha, luego de simulación de almacenamiento refrigerado.
- Sugerencia de programas óptimos de Control a todos los productores involucrados.

Método objetivo 6: Difundir los resultados del proyecto a beneficiarios finales de las zonas productoras (Región Metropolitana y, V y VI Regiones).

Se realizó un programa de difusión a beneficiarios finales de las zonas productoras de las regiones V, VI y VII (Anexo 6) mediante:

- Talleres y seminarios técnicos

- Días de campo con participación de productores pequeños y medianos asociados, profesionales y técnicos de las empresas asociadas al proyecto
- *Seminarios inaugural (2016) y final (2018)*
- Presentación de resultados del proyecto en Congresos Nacionales (SOCHIFIT / 2016-2017) e Internacional (XVII International Botrytis Symposium/2016 y Congreso de la Asociación Latinoamericana de Fitopatología, ALF/2017).
- Realización de reuniones técnicas periódicas con productores de los predios seleccionados.
- Realización de reuniones técnicas periódicas con coordinadores de las empresas asociadas.
- Publicaciones de extensión y científicas.

- **Principales problemas metodológicos enfrentados**

Durante la realización del proyecto no se presentaron problemas metodológicos que pudiesen haber afectado la ejecución y el cumplimiento de los objetivos propuestos.

- **Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto, y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta**

La principal adaptación que se debió realizar fue en relación con el método objetivo 3 “Determinar el nivel de sensibilidad a fungicidas del tipo carboxamidas e hydroxianilidas mediante la herramienta de innovación y validar presencia e incidencia mediante secuenciación y análisis microbiológicos tradicionales de sensibilidad e infección con muestras obtenidas desde los predios seleccionados.

Determinación de la presencia de mutaciones asociadas a resistencia a carboxamidas e hydroxianilidas utilizando la herramienta de innovación qPCR desarrollada”, donde se tuvo que aumentar el número de aislados de *Botrytis cinerea* recuperados en las temporadas 1 (2015-2016) y 2 (2016-2017) y una disminución en la temporada 3 (2017-2018), debido a una distribución diferente de los tratamientos fitosanitarios en las distintas temporadas con el objeto de obtener resultados aún más específicos y que reflejen de manera fidedigna la sensibilidad a nivel predial.

- **Descripción detallada de los protocolos y métodos utilizados, de manera que sea fácil su comprensión y replicabilidad.**

Protocolo para la caracterización genética de aislados de *Botrytis cinerea*:

Obtención del ADN genómico de *B. cinerea*

Obtención de biomasa: Se cultivó micelio de los distintos aislados de *B. cinerea* en medio nutritivo Agar Malta Levadura incubándose por un periodo de 6 a 7 días a 20°C y humedad de 60%, hasta obtener un crecimiento miceliar superficial en capa uniforme y con esporulación. A partir de la capa miceliar obtenida se recuperó 10 gramos de la biomasa del hongo y se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 mL.

Extracción de ADN: Se realizó mediante el protocolo del DNeasy plant mini kit (QUIAGEN).

Amplificación de PCR: Un fragmento de *erg27* y de *sdhB* fue amplificado usando los siguientes partidores: 5'-CCGCCACTTATTCCGCAGATGTT-3'/5'-CAATGGTTCCGCATTTCTTTGCCTCCC-3' y 5'-CCACTCCTCCATAATGGCTGCTCTCC-3'/5'-CTCATCAAGCCCCCTCATTGATATC-3', respectivamente. En cada caso las siguientes condiciones de reacción fueron utilizadas: 50-100ng de DNA genómico, 1X GoTaq® Green Master Mix (Promega) and 10µM de cada partidor hasta completar un volumen final de 25µL con agua nanopura (Promega). Entonces, 1µL de producto de PCR fue cargado en un gel de agarosa al 1% (OmniPur, Calbiochem), teñido con SYBR Safe DNA Stain (Invitrogen) y sometido a electroforesis por 60min a 80V en buffer TBE 0,5X, finalmente las bandas fueron visualizadas bajo un transiluminador de luz UV (UltraCam Digital Imaging, Vilber Lourmat). El producto de PCR restante fue purificado y usado para secuenciar (MACROGEN, Maryland, USA). La identificación de cambios en la secuencia de los genes de interés fue realizada usando el software BioEdit.

Genotipificación de aislados de *Botrytis cinerea* a través de análisis de fluorescencia de curvas de melting.

Para la detección de cambios en el codón 412 de *erg27* (protocolo 1) y en los codones 225 y 272 de *sdhB* (protocolo 2) se desarrolló un PCR en tiempo real (qPCR) utilizando el producto Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix (Agilent Technologies). En el protocolo 1 las siguientes condiciones de reacción fueron utilizadas: 1X de Master Mix, 500 nM de partidor 3', 50nM de partidor 5', 30 nM tinción Rox, 500 nM de sonda de prueba y 50 ng de DNA purificado de acuerdo a la metodología previamente descrita, completando un volumen final de 20 µL con agua nanopura (Promega). Los partidores forward, reverse y sonda utilizados fueron: 5'-CGGAGATCATGCCCTTGAA-3', 5'-TCACCAGACTGGTGCTGCTACA-3' y CY5-ATCGTCTACCTTGTAAGATGGA-3BHQ. El programa de PCR utilizado fue el siguiente: 30 segundos a 25°C, 3 minutos a 95°C, seguido de 50 ciclos de 15 segundos a 95°C y 40 segundos a 58°C. Luego se realizó una curva de denaturación desde 40°C a 95°C, precedida de 1 minuto de denaturación a 95°C. En el protocolo 2 las siguientes condiciones de reacción fueron utilizadas: 1X

de Master Mix, 400 nM de partidor 3', 40nM de partidor 5', 30 nM tinción Rox, 100 nM de sonda de prueba TaqmanHEX o 75nM de sonda de prueba TaqmanFAM, 50 ng de DNA purificado, completando el volumen con agua nanopura (Promega). Los partidores forward, reverse y sondas utilizadas fueron: 5'-AGAAGCTTGATGGACTTTACGA-3', 5'-GATTCAATCCCTTCGGACATGT-3', HEX-CAGATGTCGCACTATTCTACCTGC-B4Q1 (TaqmanHEX) y FAM-CGACATCTTGCCCTCCTACTGG-B4Q1 (TaqmanFAM). Para este protocolo las condiciones de PCR fueron las siguientes: 30 segundos a 25°C, 3 minutos a 95°C, seguido de 50 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 62°C. Luego se realizó una curva de denaturación desde 45°C a 95°C, precedida de 1 minuto de denaturación a 95°C. Tubos y tapas de tubos de polipropileno configurados en tiras de 8 unidades se utilizaron en ambos protocolos para montar las reacciones (Agilent Technologies). Se utilizó el equipo Mx3005P (Stratagene) para el desarrollo de la reacción de qPCR.

Genotipificación de aislados de *Botrytis cinerea* a través de análisis de curvas de melting de alta resolución (HRM, High Resolution Melting)

Para el análisis de HRM los pares de partidores 5'-CGGAGATCATGCCCTTGAA-3'/5'-TCACCAGACTGGTGCTGCTACA-3' y 5'-AGAAGCTTGATGGACTTTACGA-3'/5'-GATTCAATCCCTTCGGACATGT-3' fueron diseñados y utilizados para amplificar un fragmento de la región polimórfica de *erg27* y *sdhB*, respectivamente. La amplificación de PCR, el melting del producto amplificado y la amplificación de PCR registrando el nivel de fluorescencia en el punto final fue desarrollado en un volumen total de 20µL en un equipo Rotor-Gene Q (QUIAGEN). Cada reacción contenía 1X de Master Mix SensiFAST HRM (BIOLINE), 400nM de cada partidor, 50ng de DNA purificado bajo los criterios previamente descritos, completando el volumen con agua nanopura (Promega). Las condiciones del PCR fueron las siguientes: denaturación inicial a 95°C por 10min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15seg y 65°C por 40seg en el caso de la reacción conteniendo los partidores de para *erg27* o 62°C por 1min en el caso de la reacción conteniendo los partidores diseñados para *sdhB*. Después de la amplificación de PCR el HRM fue realizado entre 75°C y 95°C con un incremento de 0,1°C cada 2seg. Los datos resultantes fueron analizados e software Rotor-Gene Q series (QUIAGEN).

Protocolo para la caracterización fenotípica de aislados de *Botrytis cinerea*

La evaluación de la sensibilidad a boscalid, fluopyram e isofetamida se realizó a través de pruebas de germinación conidial

Se utilizaron cultivos puros de *Botrytis cinerea* de 7 días de edad, mantenidos en medio de cultivo PDA (Agar-Papa-Dextrosa). Se preparó una suspensión de cada aislado equivalente a 1×10^5 conidias/mL en agua destilada estéril. Se sembraron 200 µL de la suspensión sobre las placas de Petri conteniendo medio AA (Agar-Agua) más el

fungicida. Para boscalid se utilizaron las siguientes concentraciones: 0; 0,05; 0,1; 1; 10; 100 ppm y para fluopyram e isofetamida se utilizaron las siguientes concentraciones: 0; 0,00192; 0,0096; 0,048; 0,24; 1,2; 6; 30 ppm. Luego de 18 horas de incubación en oscuridad a 20°C se observaron bajo un microscopio las conidias, contándose un total de 100, determinando cuantas de estas estaban germinadas. Se consideró como conidia germinada cuando esta presentó una longitud del tubo germinativo igual a 3 veces el tamaño de la conidia.

La evaluación de la sensibilidad a fenhexamid, fenpirazamine y la mezcla cyprodinil&fludioxonil se realizó a través de pruebas de crecimiento micelial

Se obtuvieron discos de 5 mm de diámetro de aislados del hongo de 3 días de edad mantenidos en medio de cultivo SMY (Medio Sintético- Levadura), sembrados de forma invertida sobre placas de Petri enmendado con dosis crecientes del fungicida. Para el caso de fenhexamid y fenpirazamine se utilizaron las siguientes concentraciones: 0; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10 ppm y para la mezcla cyprodinil&fludioxonil se utilizaron las siguientes concentraciones: 0; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 ppm. La evaluación se efectuó luego de 5 días de incubación en oscuridad continua a 20°C y consistió en medir el diámetro medio de crecimiento micelial (mm).

4. Descripción de las actividades PROGRAMADAS y tareas EJECUTADAS para la consecución de los objetivos, comparación con las programadas, y razones que explican las discrepancias. (ANÁLISIS DE BRECHA)

TAREAS PROGRAMADAS	TAREAS EJECUTADAS	ANÁLISIS DE BRECHA
Método qPCR-Múltiple - FMCA para la detección de mutaciones que otorgan resistencia a carboxamidas.	Método qPCR-Múltiple - FMCA para la detección de mutaciones que otorgan resistencia a carboxamidas.	Esta tarea se realizó conforme a lo estipulado en el plan operativo
Método optimizado de qPCR - FMCA para la detección de mutaciones que otorgan resistencia a hydroxianilidas.	Método optimizado de qPCR - FMCA para la detección de mutaciones que otorgan resistencia a hydroxianilidas.	Esta tarea se realizó conforme a lo estipulado en el plan operativo.
Sistema de detección de resistencia a carboxamidas e hydroxianilidas mediante métodos de qPCR implementados.	Sistema de detección de resistencia a carboxamidas e hydroxianilidas mediante métodos de qPCR implementados. Además de la incorporación de la técnica complementaria de detección de dichas mutaciones HRM	Esta tarea se realizó conforme a lo estipulado en el plan operativo. Además se desarrolló una tarea adicional, financiada con fondos de otros proyectos, para la detección de dichas mutaciones
Set de datos asociados a efectividad de moléculas alternativas medioambientalmente amigables para el diseño de programas pilotos de control de Botrytis	Set de datos asociados a efectividad de moléculas alternativas medioambientalmente amigables para el diseño de programas pilotos de control de Botrytis	Esta tarea se realizó conforme a lo estipulado en el plan operativo
Set de datos asociados a nivel de sensibilidad a los fungicidas químicos (fenhexamid, fenpyrazamine, boscalid, fluopyram, isofetamida y a cyprodinil&fludioxonil) para el diseño de programas pilotos de control de Botrytis	Set de datos asociados a nivel de sensibilidad a los fungicidas químicos (fenhexamid, fenpyrazamine, boscalid, fluopyram, isofetamida y a cyprodinil&fludioxonil) para el diseño de programas pilotos de control de Botrytis. Además se incorporó el análisis a fludioxonil y tebuconazole	Esta tarea se realizó conforme a lo estipulado en el plan operativo. Además, de manera adicional, se realizaron evaluaciones de sensibilidad a fludioxonil y tebuconazole.
Selección de Programas Premium de Control de <i>Botrytis cinerea</i>	Selección de Programas Premium de Control de <i>Botrytis cinerea</i>	Esta tarea se realizó conforme a lo estipulado en el plan operativo
realización de 2 seminarios	4 Seminarios realizados	Esta tarea se realizó conforme a lo estipulado en el plan operativo, incorporando además 2 seminarios inicialmente no contemplados
Realización de 3 días de campo	3 días de campo realizados (uno por cada región evaluada)	Esta tarea se realizó conforme a lo estipulado en el plan operativo
Realización de 3 talleres regionales	3 talleres regionales (uno por cada región evaluada)	Esta tarea se realizó conforme a lo estipulado en el plan operativo
Asistencia a dos congresos nacionales	Dos congresos nacionales asistidos (SACH 2016, SOCHIFIT 2017), además hubo participación en Simposio Internacional de Botrytis (2016) y habrá participación en congreso SOCHIFIT 2018	Esta tarea se realizó conforme a lo estipulado en el plan operativo incluyendo además dos participaciones en este tipo de actividades.
Realización de 2 publicaciones de extensión y científicas	Se realizaron 4 publicaciones de extensión y una científica la que abarcó los resultados de la primera temporada de estudio (2015-2016), posteriormente se realizarán otras publicaciones que abarcarán los resultados obtenidos en las temporadas posteriores (2016-2017 y 2017-2018)	Esta tarea se realizó conforme a lo estipulado en el plan operativo, incorporando de manera adicional 3 publicaciones de extensión y 1 o más publicaciones científicas.
Es importante mencionar que a lo largo de la ejecución del proyecto se realizaron charlas adicionales donde se difundieron los principales resultados obtenidos		

5. Resultados del proyecto:

Descripción detallada de los principales resultados del proyecto, incluyendo su análisis y discusión; utilizando gráficos, tablas, esquemas y figuras y material gráfico que permitan poder visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones y recomendaciones relevantes del desarrollo del proyecto.

En términos de resultados se deberá hacer un cuidadoso análisis que permita evaluar la adopción de la innovación tecnológica y la sustentabilidad de la propuesta.

Esta sección el informe se deberá abordar conforme a los siguientes aspectos:

5.1 Resultados parciales obtenidos

Ya descritos en punto 5 y en informes de avance ya aprobados

5.2 Logro de Hitos. Se deberá hacer un completo y detallado análisis y reflexión en cuanto al avance, cumplimiento o eventual atraso del hito definido para el periodo. (ANÁLISIS DE BRECHA DE HITOS)

Hito 1. Diseño de sonda qPCR como herramienta de detección temprana de pérdida de sensibilidad a Carboxamidas en *Botrytis cinerea*.

Este hito se cumplió a cabalidad dentro del plazo estipulado en el plan operativo del proyecto (30-11-2016). El diseño de esta herramienta de innovación cumplió el propósito de disminuir el tiempo de detección de las mutaciones asociadas a la pérdida de sensibilidad a carboxamidas, presentes en el gen *sdhB*, como también disminuir el costo asociado a dicho servicio con respecto al análisis molecular convencional.

Hito 2. Diseño de Sonda única para la detección de las 2 potenciales mutaciones asociadas a resistencia a hydroxianilidas, en una sola reacción.

Este hito, tal como el anterior, se cumplió dentro del plazo estipulado en el plan operativo del proyecto (30-11-2016), permitiendo disminuir el tiempo de detección de las mutaciones asociadas a la pérdida de sensibilidad a Hydroxianilidas presentes en el gen *Erg27*, como también disminuir el costo asociado a dicho servicio con respecto al análisis molecular convencional.

Hito 3. Implementación y validación del método de qPCR-para la detección de mutaciones asociadas a resistencia a Carboxamidas e hydroxianilidas.

Este hito se cumplió en su totalidad, el cual fue desarrollado durante toda la ejecución del Proyecto, permitiendo el análisis molecular de detección temprana de pérdida de sensibilidad a fungicidas base para el control de *Botrytis* del 100% de los aislados recuperados desde los distintos predios de uva de mesa durante las tres temporadas en estudio (2015-2016, 2016-2017, 2017-2018), de manera rápida y confiable para el posterior diseño, aplicación y validación de los programas pilotos de control.

Hito 4. Bioensayo de virulencia miden efectividad de moléculas alternativas medioambientalmente amigables para el control de *Botrytis*.

Este hito se realizó antes de la fecha estipulada (30/09/2016) en el plan operativo del Proyecto, permitiendo conocer la efectividad de las moléculas alternativas no residuales en las cuales se encuentran los antagonistas biológicos del género *Bacillus* y *Trichoderma* como también extractos de plantas correspondiente a *Melaleuca alternifolia*. La información generada en el desarrollo de este hito se utilizó en el diseño de programas de control, incluyendo estas moléculas según su efectividad sobre aislados de *Botrytis cinerea* con distinto nivel de sensibilidad a fenhexamid y boscalid de manera tal de evitar, disminuir o revertir la resistencia generada a estos fungicidas claves.

Hito 5. Determinación de sensibilidad a fungicidas base y de pronta introducción mediante técnicas microbiológicas tradicionales.

Este hito se cumplió y su desarrollo fue a largo de todo el proyecto. Nos permitió identificar de manera *in vitro* los aislados que presentaron o no pérdida de sensibilidad a fenhexamid y a boscalid y validar la herramienta de innovación desarrollada e implementada para la detección temprana de mutaciones asociadas a resistencia a estas dos moléculas fungicidas (qPCR múltiple-FMCA). Además se pudo establecer el nivel de sensibilidad a la mezcla cyprodinil&fludioxonil, la cual forma parte central de los programas fitosanitarios de control de *Botrytis cinerea* en uva de mesa en nuestro país y de las moléculas fluopyram e isofetamida recientemente introducida y de pronta introducción respectivamente. Lo anteriormente descrito generó una robusta data para el diseño de los programas pilotos y posteriormente para la selección de los programas Premium de control.

Hito 6. Programas pilotos de control de *Botrytis* diseñados, aplicados y evaluados.

Este hito se cumplió totalmente, ya que para cada campo analizado y según su condición de sensibilidad a fenhexamid y a boscalid se diseñaron, aplicaron y evaluaron 10 tratamientos aproximadamente. Los resultados obtenidos permitieron realizar una

selección de 4 programas Premium de control para el óptimo control del patógeno. (programa piloto)

Hito 7. Dos seminarios de difusión técnica realizados con la presentación de antecedentes locales y nacionales de la situación de Botrytis en uva de mesa y resultados obtenidos en el proyecto.

Este hito se cumplió totalmente, ya que en el transcurso de la ejecución del Proyecto se realizó: Seminario Inaugural, dando a conocer información obtenida previamente en proyecto innova CORFO 2007-2010, y con los resultados iniciales obtenidos en actual Proyecto, Seminario Técnico N°1 y N°2 los cuales se presentó la información obtenida durante los meses comprendidos entre Marzo y Septiembre 2017 y Seminario Final el que informó los resultados obtenidos en la temporada 2017-2018 y las conclusiones finales de lo realizado en el transcurso del actual Proyecto.

Hito 8. Días de campos, como forma de capacitación y divulgación del Proyecto, en donde de forma directa se conversará con los productores y sus inquietudes.

Este hito se cumplió totalmente, ya que se realizaron 3 días de campo, donde se informó a los productores los resultados obtenidos, además de ver y resolver en terreno sus dudas e inquietudes.

Día de campo N°1: VI Región, 23/05/17

Día de campo N°2: RM, 06/06/17

Día de Campo N°3: V Región, 18/10/17

Hito 9. Tres talleres de capacitación técnica de personal vinculado al cultivo de la uva de mesa (1 Taller por región).

Este hito se cumplió totalmente, ya que se realizaron los tres talleres regionales establecidos en el plan operativo, donde se dieron a conocer los resultados más relevantes obtenidos en el curso del Proyecto.

Hito 10. Ponencia de resultados parciales obtenidos en la propuesta en Congreso.

Este hito se cumplió totalmente ya que se expuso en distintos congresos, tanto nacionales como internacionales, los resultados más importantes obtenidos en el desarrollo del proyecto.

Presentación Oral Congreso de la Sociedad Agronómica de Chile realizado en la facultad en Diciembre de 2016.

Presentación Oral y en paneles en Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología en Octubre de 2017

Presentación Oral en XVII International Botrytis Symposium desarrollado en Santa Cruz – Chile entre el 23 y 28 de Octubre de 2016.

Como no estaba considerado en el proyecto la participación en Eventos internacionales no se asignó porcentaje a esta actividad.

Hito 11. Publicación de extensión y científica con los resultados del proyecto y las conclusiones obtenidas.

Este hito se cumplió totalmente ya que se han realizado tres publicaciones de extensión vinculadas al proyecto:

Técnicas de detección Temprana y Desarrollo de Programas Premium de Control. Rev. RedAgrícola Julio 2016 N° 79, 34 - 37 p.

<http://www.redagricola.com/virtual/RaChile79/index.html>

Botrytis en uva de mesa y para vino ¿Qué se viene para esta temporada? Rev. RedAgrícola, Agosto 2016 N°80 52 - 57 p.

<http://www.redagricola.com/reportajes/fitosanidad/botrytis-en-uva-de-mesa-y-para-vino-que-se-viene-para-esta-temporada>

El A, B, C de Botrytis en uva de mesa de exportación. Rev. RedAgrícola, Julio, 2018 N°95 62 - 70p.

<http://www.redagricola.com/cl/papel-digital/julio-2018/>

y Una Publicación Científica:

Increase of aggressiveness levels in fenhexamid resistant (HydR3+) Botrytis cinerea phenotypes carrying erg27 gene mutations from table grape in Chile.

Enviada a International Journal of Food Microbiology (Anexo 5)

5.3 Actualizar análisis económico con y sin proyecto

La uva de mesa es la principal especie del rubro frutícola del país, aportando significativamente al Producto Interno Bruto. Durante su producción es afectada por la Pudrición Gris causada por *Botrytis cinerea* principal problema fitopatológico en Chile. Actualmente, su control se basa principalmente en la aplicación de productos químicos en los periodos más susceptibles para la infección, sin embargo en nuestro país, como también en distintos lugares del mundo se ha reportado pérdida de sensibilidad a las principales moléculas fungicidas utilizadas, provocando importantes pérdidas económicas en el cultivo de este frutal y una disminución en la vida útil de estos productos químicos. Es por este motivo la importancia de monitorear la sensibilidad de las poblaciones de *Botrytis*, a los fungicidas utilizados para su control. De este modo, la técnica molecular desarrollada e implementada en este proyecto permite establecer de forma rápida y confiable el comportamiento de los aislados del hongo frente a la aplicación de los productos fungicidas. A pesar de la tecnología asociada a la técnica, resulta ser comparativamente más económica que la técnica molecular tradicional, disminuyendo considerablemente los costos asociados a la producción de uva de mesa. Además, el productor al conocer la condición de sensibilidad de su predio, el programa fitosanitario que aplique tendrá un mayor control sobre *Botrytis* y por lo tanto menores rechazos de la fruta y pérdidas económicas en los puertos de destino. Por otro lado, se incorporarán a los programas de control moléculas fungicidas no residuales y se mantendrá por un mayor periodo la vida útil de los productos fungicidas, beneficiándose de esta manera tanto las empresas agroquímicas como distribuidores.

5.4 Análisis de impacto logrado a la fecha medido y diferenciando en al menos los siguientes aspectos: descripción y cuantificación de los impactos obtenidos, y estimación de lograr otros en el futuro, comparación con los esperados, y razones que explican las discrepancias; ventas y/o anuales (\$), nivel de empleo anual (JH), número de productores o unidades de negocio que pueden haberse replicado y generación de nuevas ventas y/o servicios; nuevos empleos generados por efecto del proyecto, nuevas capacidades o competencias científicas, técnicas y profesionales generadas.

Este punto no se relaciona con el proyecto desarrollado, ya que su propósito principal fue diseñar programas óptimos de control de *Botrytis cinerea* mediante el desarrollo e implementación de una herramienta tecnológica.

5.4 Resultados e impactos

La herramienta molecular de diagnóstico implementada, va a permitir a los productores, empresas relacionadas (agroquímicas como exportadoras) conocer el nivel real de sensibilidad al menos a dos de las familias fungicidas más importantes de uso actual en los programas de control de botrytis en uva de mesa, principal problema de índole fitopatológico que afecta a este importante cultivo en Chile como a nivel mundial. Y en base a esta información diseñar programas de control adecuados a su realidad particular. Por otro lado, al comprobarse el beneficio de introducir en éstos programas moléculas alternativas no residuales, se ha despertado el interés en los productores y en la industria en general de la importancia que este tipo de productos tiene, ya que con el uso de algunos de éstos se puede recuperar la eficacia de las principales moléculas fungicidas de alta eficiencia, y producir fruta sana y con menos carga residual, lo cual permitirá que nuestra fruta acceda a más y mejores mercados, obteniendo mejores retornos a nivel productor, exportador y a nivel país.

Por otro lado, el desarrollo del proyecto permitió la formación de capital humano, mediante la realización de distintas Memorias de Título, Tesis de Magíster. Además, la información generada en el estudio y su trabajo propició la obtención de becas de Magíster y Doctorado de integrantes de la Unidad Ejecutora.

De acuerdo a lo anteriormente descrito, la unidad ejecutora mantiene su liderazgo en el estudio de Resistencia a fungicidas de *Botrytis cinerea* a nivel nacional.

5.6 En la medida que los resultados obtenidos permitan la elaboración de una ficha técnica (ejemplo ficha de cultivo), ésta debe ser adjuntada al informe.

Los resultados obtenidos no permiten la elaboración de una ficha técnica.

6. Fichas técnicas y análisis económico del cultivo, rubro, especie animal o tecnología que se desarrolló en el proyecto, junto con un análisis de las perspectivas del rubro después de finalizado el proyecto

Análisis económico de la herramienta biotecnológica de detección temprana de pérdida sensibilidad a Hydroxianilidas y Carboxamidas

Hydroxianilidas

e) COSTOS POR AISLADO DE BOTRYTIS CINEREA 1 SONDA CON SECUENCIACIÓN	\$ 48.000
<i>f) COSTOS POR AISLADO DE BOTRYTIS CINEREA 1 SONDA SIN SECUENCIACIÓN</i>	\$ 24.000 *
g) COSTOS POR AISLADO DE BOTRYTIS CINEREA 3 SONDAS CON SECUENCIACIÓN	\$ 62.000
h) COSTOS POR AISLADO DE BOTRYTIS CINEREA 3 SONDAS SIN SECUENCIACIÓN	\$ 34.000

Carboxamidas

e) COSTOS POR AISLADO DE BOTRYTIS CINEREA 1 SONDA CON SECUENCIACIÓN	\$ 48.000
<i>f) COSTOS POR AISLADO DE BOTRYTIS CINEREA 1 SONDA SIN SECUENCIACIÓN</i>	\$ 24.000 *
g) COSTOS POR AISLADO DE BOTRYTIS CINEREA 5 SONDAS CON SECUENCIACIÓN	\$ 65.000
h) COSTOS POR AISLADO DE BOTRYTIS CINEREA 5 SONDAS SIN SECUENCIACIÓN	\$ 42.000

Como se indica en el Cuadro anterior, el valor del servicio al incorporar las herramientas tecnológicas disminuye en al menos un 30% (véanse y compárense a con c y b con d).

7. Problemas enfrentados durante la ejecución proyecto (legal, técnico, administrativo, de gestión) y las medidas tomadas para enfrentar cada uno de ellos.

8. Durante la ejecución del Proyecto no hubo problemas importantes que pudiesen haber afectado el desarrollo del mismo.

9. Difusión de los resultados obtenidos adjuntando las publicaciones realizadas en el marco del proyecto o sobre la base de los resultados obtenidos, el material de difusión preparado y/o distribuido, las charlas, presentaciones y otras actividades similares ejecutadas durante la ejecución del proyecto.

Este punto se ha desarrollado en cada uno de los informes técnicos de avance entregados a FIA.

10. Productores participantes

Antecedentes globales de participación de productores

REGIÓN	TIPO PRODUCTOR	GÉNERO FEMENINO	GÉNERO MASCULINO	ETNIA (INDICAR SI CORRESPONDE)	TOTALES
V	PRODUCTORES PEQUEÑOS				
	PRODUCTORES MEDIANOS-GRANDES		X	-	1
RM	PRODUCTORES PEQUEÑOS				
	PRODUCTORES MEDIANOS-GRANDES		X	-	5

Antecedentes específicos de participación de productores

NOMBRE	UBICACIÓN PREDIO			Superficie Hàs	Fecha ingreso al proyecto
	Región	Comuna	Dirección Postal		
Agrícola Nova S.A. Fundo La Quisca	RM	Paine		Total: 150, 29 Ha; Uva de mesa: 81,51 Ha.	Temporada 2016-2017
Sociedad Agrícola Los Carrizos Ltda.	VI Región	San Vicente de Tagua Tagua		Total: 145 Ha; Uva de mesa: 100 Ha.	Temporada 2016-2017
Rene Alberto Valle Villa	RM	Paine		Total: 40,7 Ha; Uva de mesa: 21,7 Ha.	Temporada 2016-2017
Comercial y Frutícola De La Fuente Ltda.	RM	Melipilla		Total: 42,5 Ha; Uva de mesa: 32 Ha.	Temporada 2016-2017
Liceo Agrícola Juan Pablo II de Nancagua	VI Región	Nancagua		----	Temporada 2016-2017

Agrícola UAC Fundo <i>Catemu</i>	V Región	Catemu		Total: 136,90 Ha; Uva de mesa: 107,71 Ha.	Temporada 2015-2016
Agrícola UAC Fundo La Paloma	RM	Lampa		Total: 273,59 Ha; Uva de mesa: 210,01 Ha.	Temporada 2015-2016
Agrícola UAC Fundo Zuñiga	VI Región	San Vicente		Total: 68,06 Ha; Uva de mesa: 68,06 Ha.	Temporada 2015-2016
Agrícola UAC Fundo Nancagua	VI Región	Nancagua		Total: 85,06 Ha; Uva de mesa: 85,06 Ha.	Temporada 2015-2016
Sociedad Agrícola La Hornilla SpA.	RM	Calera de Tango		Total: 170 Ha; Uva de mesa: 21 Ha.	Temporada 2015-2016

11. Conclusiones

Según lo descrito en este informe, durante la ejecución del Proyecto se obtuvieron importantes resultados que dan cuenta de lo importante que es el monitoreo de la *sensibilidad que presentan las poblaciones de Botrytis cinerea a diversos fungicidas* utilizados para su control, de esta forma, el desarrollo e implementación de la técnica molecular de qPCR multiplex permitió conocer el comportamiento de sensibilidad de este patógeno de manera rápida y confiable para posteriormente y de forma oportuna diseñar programas de manejo fitosanitarios enfocados según la necesidad del predio analizado.

Según los resultados obtenidos, la mayor parte de las aplicaciones de los tratamientos Premium, diseñados por parte del Laboratorio de Fitopatología, el control de *Botrytis cinerea* fue significativamente mayor con respecto a la aplicación del tratamiento tradicional del campo, validándose de esta manera la importancia que tiene saber la condición de sensibilidad de este hongo tan perjudicial en la agricultura chilena.

12. Recomendaciones

No existen recomendaciones en el desarrollo de este proyecto

13. Otros aspectos de interés

No existen otros aspectos de interés a mencionar

14. Anexos

Anexo 1. Valores EC₅₀, MÍN, MÁX, PROMEDIOS y Mediana detectados por época / temporada y por Región a las 7 moléculas botrycidas de alta eficiencia evaluadas.

A) PRE-COSECHA TEMPORADA 2015-2016

	N°aislados / Región		Fenhexamid	Fenpyramine	boscalid	Fluopyram	isofetamida	Fludioxonil	Cyprodinil & fludioxonil
EC ₅₀ (µg/mL) menor	Total	142	0,03	0,03	0,25	0,01	0,02	0,0001	0,012
	V R	24	0,06	0,07	0,30	0,06	0,15	0,0001	0,015
	RM	47	0,23	0,20	0,58	0,03	0,05	0,0001	0,012
	VI R	71	0,03	0,03	0,25	0,01	0,02	0,0222	0,030
EC ₅₀ (µg/mL) mayor	Total	142	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,531	0,363
	V R	24	43,26	100,00	100,00	1,40	1,27	0,531	0,363
	RM	47	100,00	100,00	100,00	94,07	100,00	0,116	0,160
	VI R	71	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,397	0,274
Mediana	Total	142	12,72	100,00	19,81	0,32	0,43	0,049	0,105
	V R	24	14,23	49,64	1,75	0,36	0,36	0,026	0,088
	RM	47	12,13	100,00	100,00	0,30	0,35	0,025	0,083
	VI R	71	12,54	100,00	13,82	0,32	0,63	0,084	0,141
Promedio	Total	142	24,09	62,41	48,51	7,05	13,23	0,073	0,114
	V R	24	15,73	55,15	26,04	0,50	0,43	0,058	0,115
	RM	47	23,17	64,94	62,79	4,08	10,98	0,038	0,076
	VI R	71	27,53	63,20	46,65	11,24	19,04	0,101	0,138

B) FLORACIÓN TEMPORADA 2016/17

		N° aislados	fenhexamid	fenpyrazamine	boscalid	fluopyram	isofetamida	fludioxonil	cyprodinil & fludioxonil
EC₅₀ (µg/mL) menor	Total	426	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,0001	0,002
	V R	60	0,00	0,09	0,05	0,03	0,07	0,0077	0,002
	RM	226	0,02	0,04	0,16	0,00	0,00	0,0001	0,007
	VI R	140	0,01	0,00	0,15	0,00	0,00	0,0001	0,009
EC₅₀ (µg/mL) mayor	Total	426	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	2,373	0,749
	V R	60	69,71	100,00	100,00	4,77	20,68	2,373	0,749
	RM	226	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,630	0,351
	VI R	140	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,096	0,358
Mediana	Total	426	10,48	100,00	100,00	1,03	0,87	0,041	0,117
	V R	60	11,02	100,00	100,00	0,75	0,87	0,132	0,254
	RM	226	9,47	100,00	100,00	1,26	1,03	0,040	0,090
	VI R	140	11,17	100,00	100,00	0,83	0,69	0,037	0,143
Promedio	Total	426	16,06	60,59	70,79	23,61	23,09	0,096	0,137
	V R	60	10,75	66,49	73,37	0,97	1,54	0,414	0,262
	RM	226	10,66	57,67	67,27	31,56	29,19	0,050	0,104
	VI R	140	27,06	62,77	75,37	20,49	22,49	0,036	0,138

C) PRECOSECHA TEMPORADA 2016/17

		N° aislados	fenhexamid	fenpyrazamine	boscalid	fluopyram	isofetamid	fludioxonil	cyprodinil & fludioxonil
EC₅₀ (µg/mL) menor	Total	618	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,0001	0,001
	V R	94	0,02	0,05	0,10	0,02	0,00	0,0129	0,018
	RM	261	0,02	0,00	0,02	0,00	0,02	0,0005	0,001
	VI R	263	0,01	0,00	0,06	0,00	0,00	0,0001	0,014
EC₅₀ (µg/mL) mayor	Total	618	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,627	0,442
	V R	94	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,244	0,323
	RM	261	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,627	0,355
	VI R	263	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,530	0,442
Mediana	Total	618	12,73	100,00	100,00	1,07	0,57	0,042	0,128
	V R	94	12,92	100,00	100,00	0,93	0,11	0,040	0,099
	RM	261	12,37	100,00	100,00	1,90	4,53	0,041	0,129
	VI R	263	13,38	100,00	100,00	0,81	0,40	0,042	0,134
Promedio	Total	618	16,42	69,85	70,53	21,99	27,16	0,058	0,130
	V R	94	16,60	66,52	76,89	8,66	3,51	0,057	0,102
	RM	261	16,20	62,64	77,64	30,15	39,62	0,056	0,134
	VI R	263	16,58	78,20	61,20	18,64	23,24	0,060	0,135

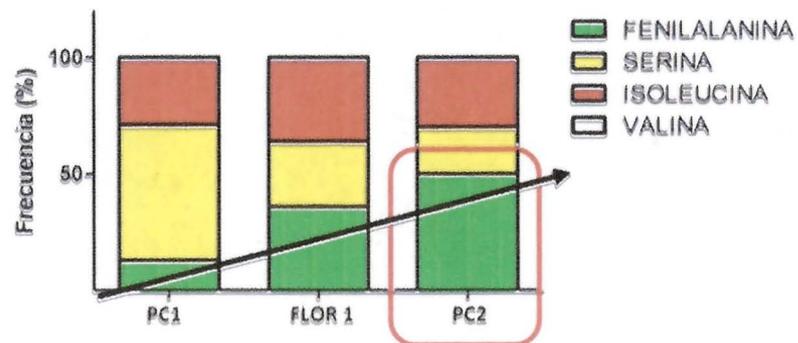
D) FLORACIÓN TEMPORADA 2017/18

		N° aislados	fenhexamid	fenpyrazamine	boscalid	fluopyram	isofetamid	fludioxonil	cyprodinil & fludioxonil
EC₅₀ (µg/mL) menor	Total	426	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,0001	0,002
	V R	60	0,00	0,09	0,05	0,03	0,07	0,0077	0,002
	RM	226	0,02	0,04	0,16	0,00	0,00	0,0001	0,007
	VI R	140	0,01	0,00	0,15	0,00	0,00	0,0001	0,009
EC₅₀ (µg/mL) mayor	Total	426	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	2,373	0,749
	V R	60	69,71	100,00	100,00	4,77	20,68	2,373	0,749
	RM	226	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,630	0,351
	VI R	140	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,096	0,358
Mediana	Total	426	10,48	100,00	100,00	1,03	0,87	0,041	0,117
	V R	60	11,02	100,00	100,00	0,75	0,87	0,132	0,254
	RM	226	9,47	100,00	100,00	1,26	1,03	0,040	0,090
	VI R	140	11,17	100,00	100,00	0,83	0,69	0,037	0,143
Promedio	Total	426	16,06	60,59	70,79	23,61	23,09	0,096	0,137
	V R	60	10,75	66,49	73,37	0,97	1,54	0,414	0,262
	RM	226	10,66	57,67	67,27	31,56	29,19	0,050	0,104
	VI R	140	27,06	62,77	75,37	20,49	22,49	0,036	0,138

E) PRECOSECHA TEMPORADA 2017/18

		N° aislados	fenhexamid	fenpyrazamine	boscalid	fluopyram	isofetamid	fludioxonil	cyprodinil & fludioxonil
EC₅₀ (µg/mL) menor	Total	386	0,00	0,02	0,07	0,00	0,01	0,0001	0,002
	V R	44	0,45	0,20	0,21	0,05	0,14	0,0183	0,008
	RM	202	0,00	0,05	0,07	0,05	0,01	0,0001	0,002
	VI R	140	0,02	0,02	0,10	0,00	0,04	0,0001	0,002
EC₅₀ (µg/mL) mayor	Total	386	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,488	0,656
	V R	44	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,488	0,431
	RM	202	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,082	0,469
	VI R	140	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,169	0,656
Mediana	Total	386	12,92	100,00	100,00	3,28	4,52	0,034	0,096
	V R	44	12,54	100,00	100,00	5,01	0,76	0,033	0,116
	RM	202	12,72	100,00	100,00	3,60	35,46	0,034	0,093
	VI R	140	13,38	100,00	100,00	1,83	1,79	0,032	0,094
Promedio	Total	386	28,52	85,63	86,49	24,48	41,71	0,042	0,112
	V R	44	21,79	94,10	86,50	26,32	26,65	0,066	0,154
	RM	202	30,49	85,44	86,77	26,71	47,75	0,037	0,100
	VI R	140	27,80	83,24	86,10	20,68	37,75	0,043	0,116

Anexo 2. Predio con alta resistencia inicial a fenhexamid y leve resistencia a boscalid. Tratamiento con menor nivel de pudrición final

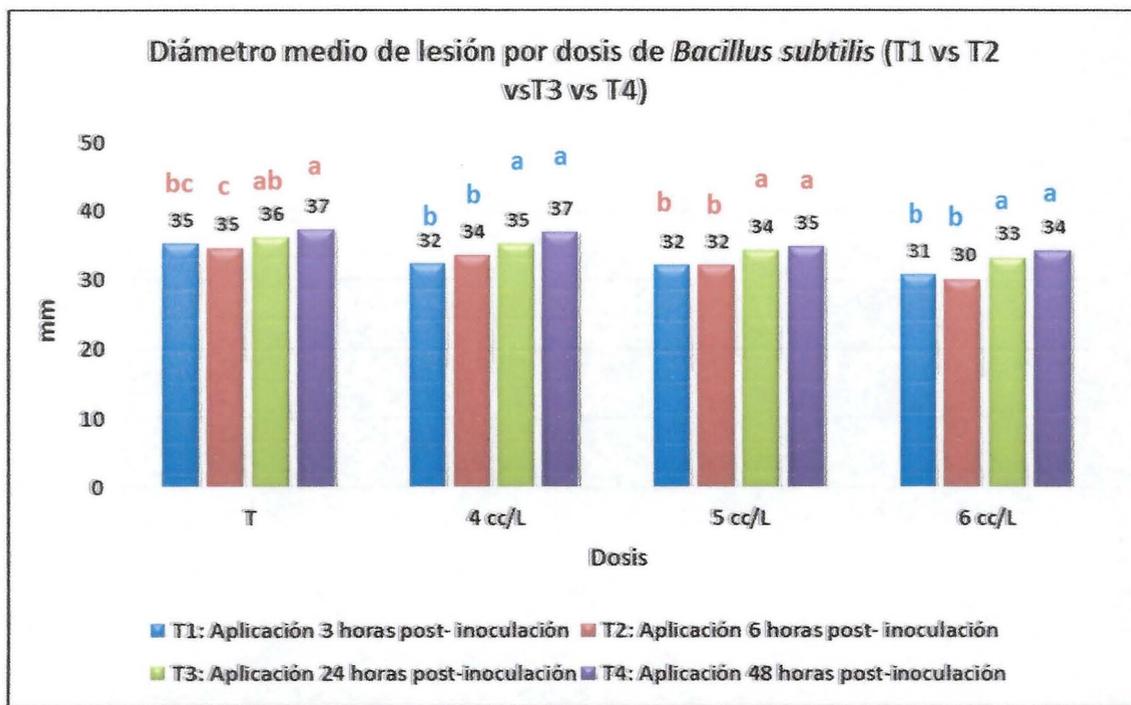
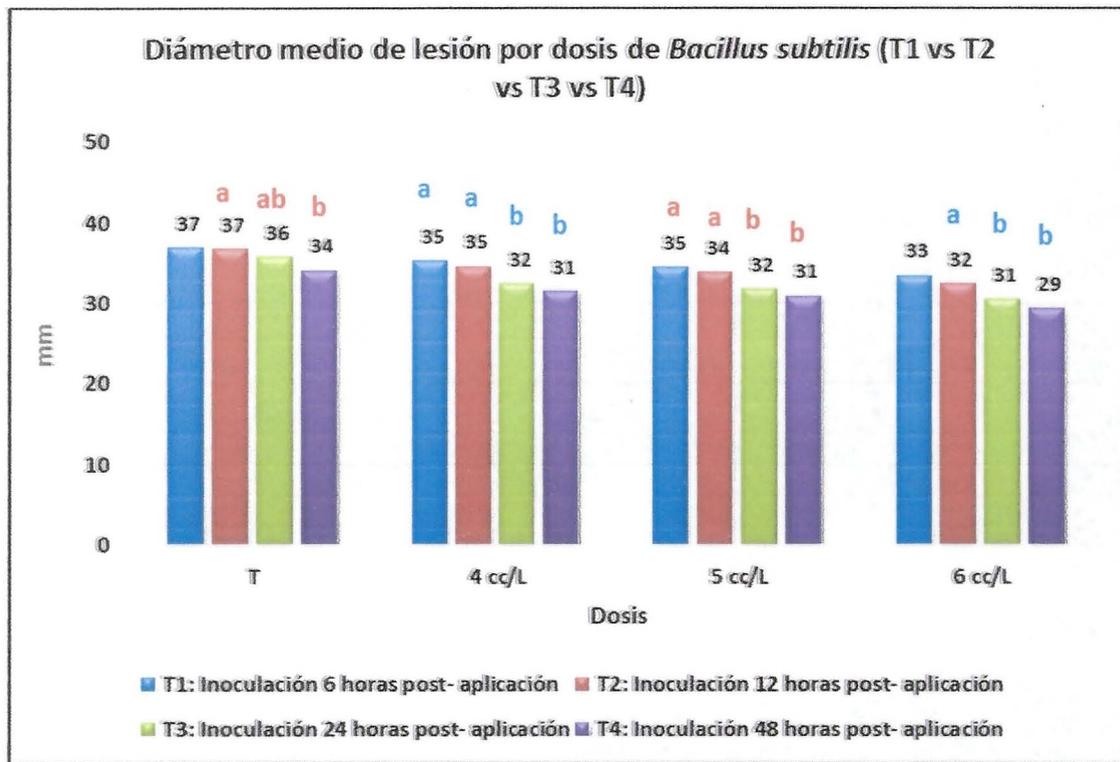


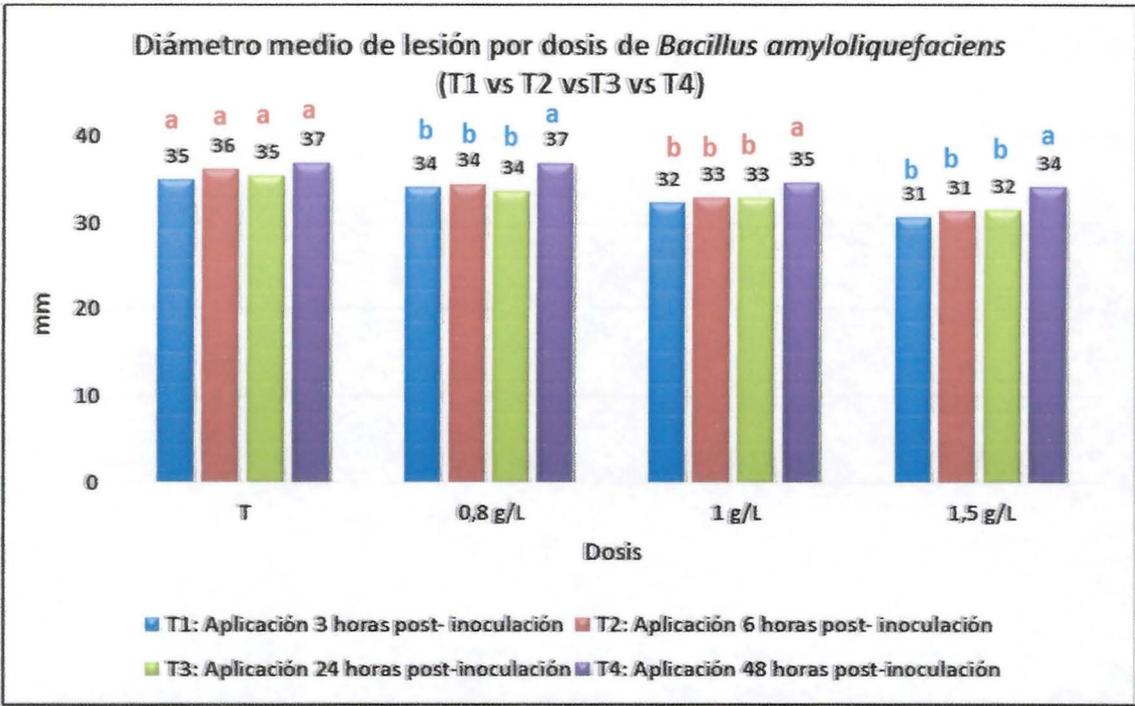
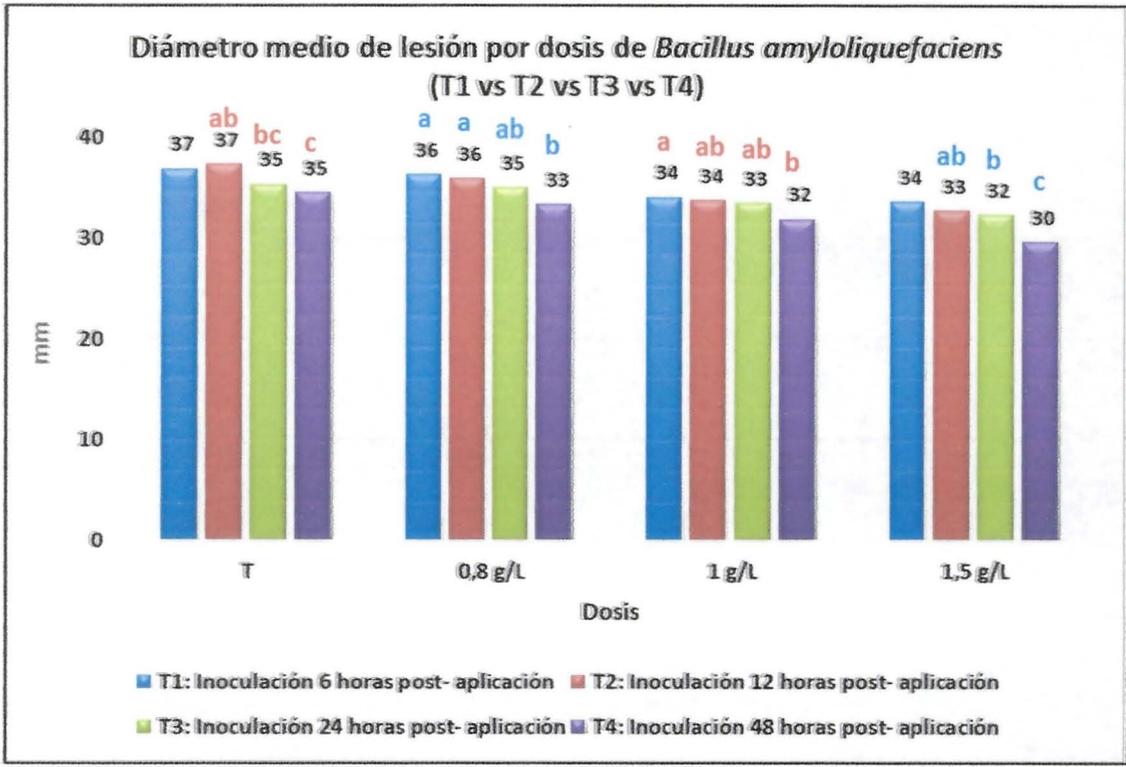
Tratamiento efectuado en temporada 2016/17.
 Frecuencia de mutaciones asociadas a fenhexamid detectadas PC1: en precosecha 2015/16, en flor de 2016/17 y en precosecha de 2016/17 (PC1, FLOR 1 y PC2, respectivamente). Incremento de aislados silvestres sin mutación en codón 412, (Fenilalanina).

Con el uso de antagonistas biológicos y de extractos de plantas se puede lograr

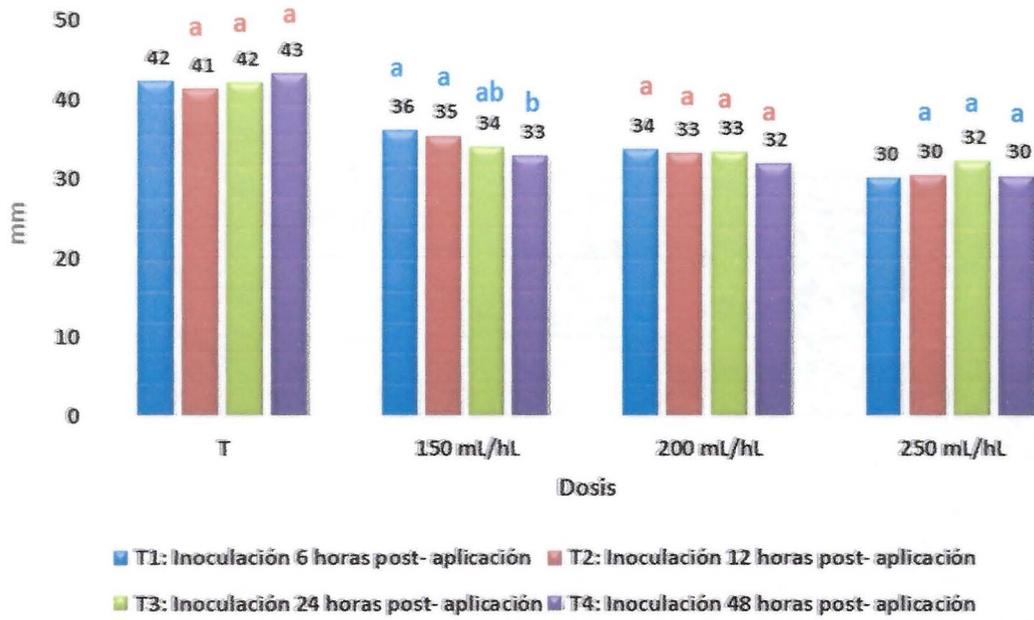
Épocas de aplicación	Periodo crítico de infección más importante en uva de mesa			En este periodo es importante eliminar los restos florales senescentes contaminados, también la presencia de otros agentes patógenos: Oidio y algunos asociados a pudrición ácida			Segundo periodo crítico Disminuyen los compuestos antifúngicos, y las bayas son más susceptibles	Tercer periodo crítico, lo que no se controló en flor, ...			
	Caliptra Rajada	Inicio de Flor	Plena Flor	Post Flor	Cierre de Racimo	Pre Envero	Envero	Pre Cosecha 1	Pre Cosecha 2	Pre Cosecha 3	Pre Cosecha 4 Aplicación extra
Tratam. 6	Trichonativa	Cyprodinil & fludioxonil	boscalid	Trichonativa	Timorex	bellis	Cyprodinil & fludioxonil	Serifel	Serifel	Timorex	Timorex

Anexo 3. Resultados obtenidos en bio ensayos de virulencia de aislados de *Botrytis cinerea* de disitnto nivel de sensibilidad a fenhexamid y boscalid, realizados en plantas de pepino (*Cucumis sativus*)

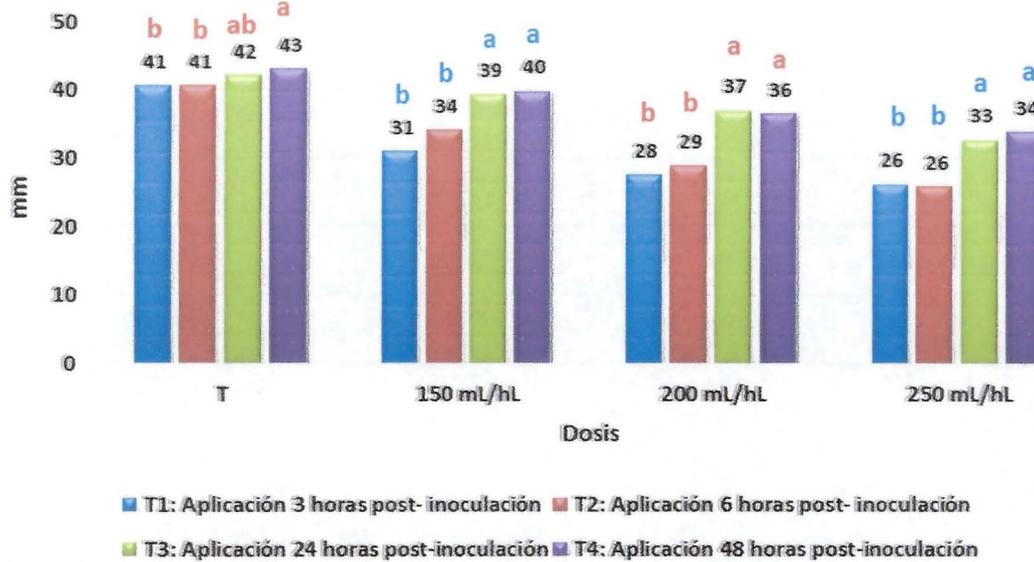


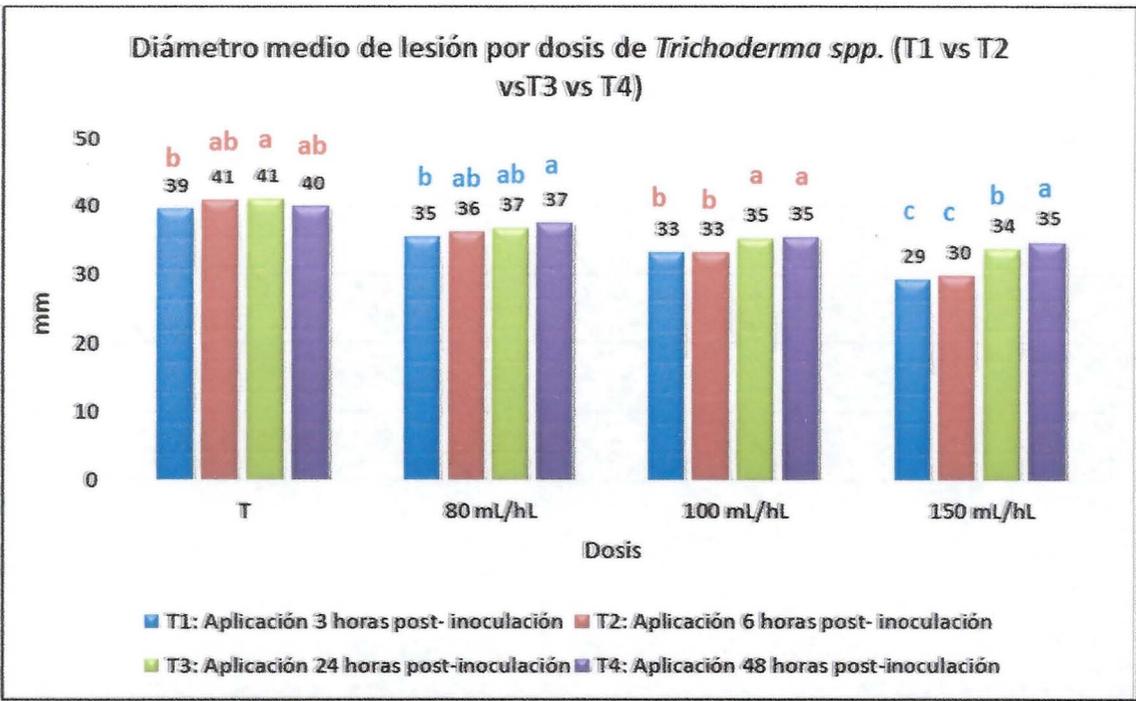
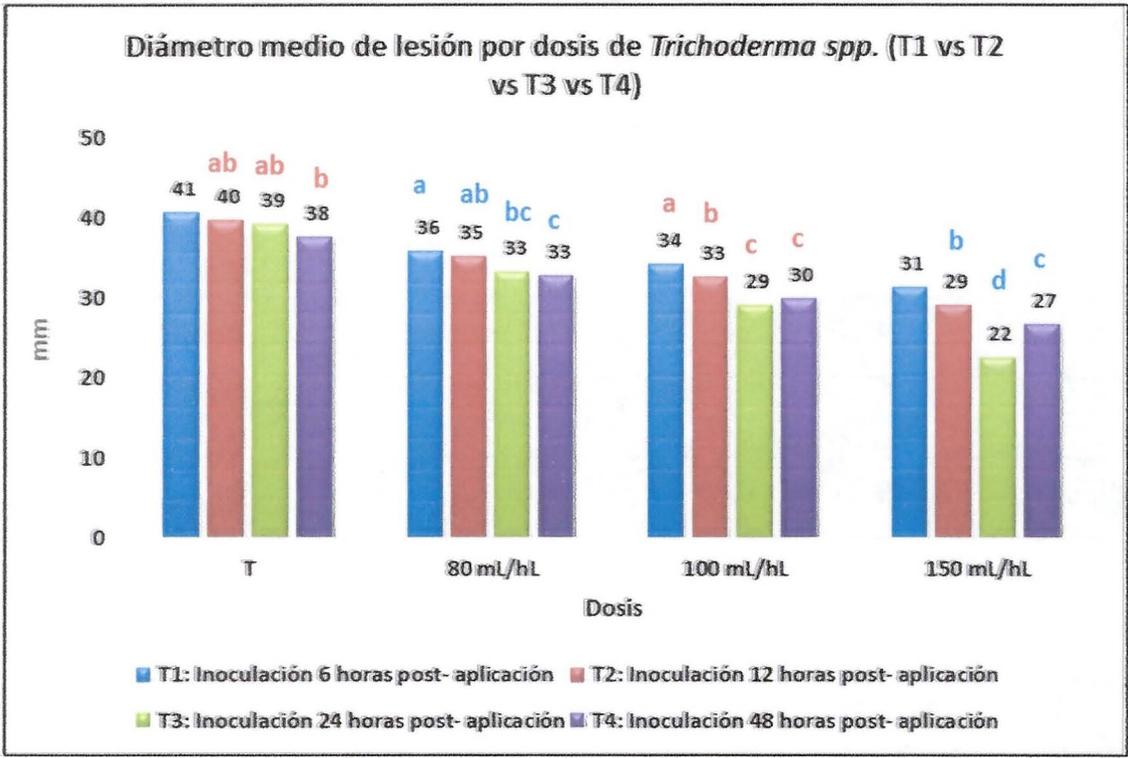


Diámetro medio de lesión por dosis de *Melaleuca alternifolia* (T1 vs T2 vs T3 vs T4)



Diámetro medio de lesión por dosis de *Melaleuca alternifolia* (T1 vs T2 vs T3 vs T4)





Anexo 4. Tratamientos Premium de control según frecuencia de aislados sensibles, resistentes, mutaciones en el gen *Erg27*, en el gen *sdhB* y nivel de pudrición final

Predio 1 V Región

Tratamiento	Caliptra Rajada	Inicio de Flor	Plena Flor	Termino de Flor	Entre	Cierre de Racimo	Pre Envero	Envero	Pre Cosecha 1	Pre Cosecha 2
4	Trichonativa	Switch	Miravis Prime	Timorex Gold	Trichonativa	Timorex Gold	Bellis	Switch	Timorex Gold	Teldor

	Parámetros	floración 2017-2018		pre-cosecha 2017-2018	
		fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid
T4	Sensibilidad EC ₅₀ (µg/ml)	9,24	73,53	18,48	100,00
	% aislados resistentes	100,00	83,00	91,00	100,00
	% aislados sensibles	0,00	17,00	9,00	0,00
	Erg27 % aislados sensibles	75,00	----	18,18	----
	P225 % aislados sensibles	----	91,67	----	100,00
	H272 % aislados sensibles	----	25,00	----	0,00
	Infección en post-cosecha (%)	0,28 (65 días)			

	Parámetros	pre-cosecha 2015-2016		floración 2016-2017		pre-cosecha 2016-2017		floración 2017-2018		pre-cosecha 2017-2018	
		fenhexamid	boscalid								
TDC	Sensibilidad EC ₅₀ (µg/ml)	15,73	26,04	8,18	100,00	0,03	96,58	4,74	9,76	20,28	66,80
	% aislados resistentes	88,00	25,00	83,00	100,00	0,00	100,00	67,00	8,00	82,00	67,00
	% aislados sensibles	12,00	75,00	17,00	0,00	100,00	0,00	33,00	92,00	18,00	33,00
	Erg27 % aislados sensibles	12,50	----	25,00	----	83,33	----	100,00	----	30,00	----
	P225 % aislados sensibles	----	100,00	----	100,00	----	100,00	----	100,00	----	100,00
	H272 % aislados sensibles	----	75,00	----	16,67	----	0,00	----	83,33	----	40,00
	Infección en post-cosecha (%)	0,65 (41 días)		0,23 (35 días)				0,34 (65 días)			

Predio 2 RM

Tratamiento	Caliptra Rajada	Inicio de Flor	Entre	Plena Flor	Termino de Flor	Entre	Cierre de Racimo	Pre Envero	Envero	Pre Cosecha 1	Pre Cosecha 2
3	Trichonativa	Luna Tranquility	Serifel	Switch	Serifel	Trichonativa	Timorex Gold	Bellis	Switch	Serifel	Teldor

	Parámetros	floración 2017-2018		pre-cosecha 2017-2018	
		fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid
T3	Sensibilidad EC ₅₀ (µg/mL)	7,41	50,51	12,36	64,01
	% aislados resistentes	75,00	50,00	100,00	64,00
	% aislados sensibles	25,00	50,00	0,00	36,00
	Erg27 % aislados sensibles	41,67	----	0,00	----
	P225 % aislados sensibles	----	100,00	----	100,00
	H272 % aislados sensibles	----	50,00	----	36,36
	Infección en post-cosecha (%)	0,11 (53 días)			

	Parámetros	pre-cosecha 2015-2016		floración 2016-2017		pre-cosecha 2016-2017		floración 2017-2018		pre-cosecha 2017-2018	
		fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid
TDC	Sensibilidad EC ₅₀ (µg/mL)	15,99	34,76	3,60	0,86	12,28	100,00	62,30	70,37	19,35	70,38
	% aislados resistentes	100,00	42,00	17,00	0,00	100,00	100,00	100,00	70,00	73,00	70,00
	% aislados sensibles	0,00	58,00	83,00	100,00	0,00	0,00	0,00	30,00	27,00	30,00
	Erg27 % aislados sensibles	20,83	----	75,00	----	0,00	----	0,00	----	30,00	----
	P225 % aislados sensibles	----	100,00	----	100,00	----	0,00	----	25,00	----	100,00
	H272 % aislados sensibles	----	95,83	----	100,00	----	100,00	----	100,00	----	30,00
	Infección en post-cosecha (%)	0,99 (42 días)		1,03 (53 días)				0,40 (53 días)			

Predio 3 RM

Tratamiento	Caliptra Rajada	Inicio de Flor	Plena Flor	Termino de Flor	Entre	Cierre de Racimo	Pre Envero	Envero	Pre Cosecha 1	Pre Cosecha 2
4	Trichonativa	Switch	Luna Tranquility	Serenade Aso	Trichonativa	Timorex Gold	Bellis	Switch	Serenade ASO	Teldor

	Parámetros	floración 2017-2018		pre-cosecha 2017-2018	
		fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid
T4	Sensibilidad EC ₅₀ (µg/mL)	8,88	83,68	12,48	100,00
	% aislados resistentes	67,00	90,00	100,00	100,00
	% aislados sensibles	33,00	10,00	0,00	0,00
	Erg27 % aislados sensibles	8,33	----	0,00	----
	P225 % aislados sensibles	----	100,00	----	100,00
	H272 % aislados sensibles	----	25,00	----	0,00
Infección en post-cosecha (%)		2,23 (58 días)			

	Parámetros	pre-cosecha 2015-2016		floración 2016-2017		floración 2017-2018		pre-cosecha 2017-2018	
		fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid
TDC	Sensibilidad EC ₅₀ (µg/mL)	29,39	92,36	12,58	1,21	14,55	100,00	27,89	100,00
	% aislados resistentes	79,00	100,00	100,00	0,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	% aislados sensibles	21,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Erg27 % aislados sensibles	20,83	----	0,00	----	0,00	----	0,00	----
	P225 % aislados sensibles	----	79,17	----	100,00	----	100,00	----	100,00
	H272 % aislados sensibles	----	45,83	----	100,00	----	33,33	----	0,00
Infección en post-cosecha (%)		2,21 (30 días)		0,28 (41 días)		1,99 (58 días)			

Predio 4 RM

Parámetros	floración 2016-2017		pre-cosecha 2016-2017		floración 2017-2018		pre-cosecha 2017-2018	
	fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid
Sensibilidad EC₅₀ (µg/ml)	1,47	73,04	8,23	77,30	12,46	77,92	41,33	59,24
% aislados resistentes	11,00	83,00	61,00	81,00	50,00	78,00	41,00	59,00
% aislados sensibles	89,00	17,00	39,00	19,00	50,00	22,00	59,00	41,00
Erg27 % aislados sensibles	88,89	----	38,89	----	55,56	----	58,82	----
P225 % aislados sensibles	----	94,44	----	94,44	----	88,89	----	100,00
H272 % aislados sensibles	----	44,44	----	33,33	----	11,11	----	58,82
Infección en post-cosecha (%)	1,30 (32 días)				4,05 (36 días)			

Predio 5 RM

Tratamiento	Caliptra Rajada	Inicio de Flor	Plena Flor	Termino de Flor	Entre	Cierre de Racimo	Pre Envero	Envero	Pre Cosecha 1	Pre Cosecha 2
2	Trichonativa	Switch	kamuy	Serifel	Trichonativa	Serifel	Bellis	Switch	Serifel	Teldor

	Parámetros	floración 2017-2018		pre-cosecha 2017-2018	
		fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid
T2	Sensibilidad EC ₅₀ (µg/mL)	10,19	100,00	54,27	100,00
	% aislados resistentes	92,00	100,00	83,00	100,00
	% aislados sensibles	8,00	0,00	17,00	0,00
	Erg27 % aislados sensibles	0,00	----	16,67	----
	P225 % aislados sensibles	----	100,00	----	100,00
	H272 % aislados sensibles	----	0,00	----	0,00
Infección en post-cosecha (%)		0,39 (74 días)			

	Parámetros	floración 2016-2017		pre-cosecha 2016-2017		floración 2017-2018		pre-cosecha 2017-2018	
		fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid
TDC	Sensibilidad EC ₅₀ (µg/mL)	10,90	40,25	14,64	100,00	2,91	81,92	31,09	100,00
	% aislados resistentes	89,00	44,00	94,00	100,00	27,00	82,00	100,00	100,00
	% aislados sensibles	11,00	56,00	6,00	0,00	73,00	18,00	0,00	0,00
	Erg27 % aislados sensibles	16,67	----	5,56	----	25,00	----	0,00	----
	P225 % aislados sensibles	----	55,56	----	11,11	----	100,00	----	100,00
	H272 % aislados sensibles	----	94,44	----	88,89	----	0,00	----	0,00
Infección en post-cosecha (%)		0,45 (89 días)				0,24 (74 días)			

Predio 6 RM

Tratamiento	Caliptra Rajada	Inicio de Flor	Plena Flor	Termino de Flor	Entre	Cierre de Racimo	Pre Envero	Envero	Pre Cosecha 1	Pre Cosecha 2
2	Trichonativa	Switch	cantus	Serifel	Trichonativa	Serifel	Bellis	Switch	Serifel	Teldor

	Parámetros	floración 2017-2018		pre-cosecha 2017-2018	
		fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid
T2	Sensibilidad EC ₅₀ (µg/mL)	4,56	47,12	16,65	91,74
	% aislados resistentes	83,00	50,00	100,00	92,00
	% aislados sensibles	17,00	50,00	0,00	8,00
	Erg27 % aislados sensibles	41,67	----	50,00	----
	P225 % aislados sensibles	----	100,00	----	100,00
	H272 % aislados sensibles	----	0,00	----	8,33
	Infección en post-cosecha (%)	0,81 (63 días)			

	Parámetros	floración 2016-2017		pre-cosecha 2016-2017		floración 2017-2018		pre-cosecha 2017-2018	
		fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid
TDC	Sensibilidad EC ₅₀ (µg/mL)	18,08	77,98	15,28	100,00	6,24	20,18	47,46	90,08
	% aislados resistentes	100,00	78,00	100,00	100,00	67,00	25,00	100,00	90,00
	% aislados sensibles	0,00	22,00	0,00	0,00	33,00	75,00	0,00	10,00
	Erg27 % aislados sensibles	5,56	----	16,67	----	0,00	----	0,00	----
	P225 % aislados sensibles	----	72,22	----	61,11	----	100,00	----	100,00
	H272 % aislados sensibles	----	38,89	----	38,89	----	0,00	----	10,00
	Infección en post-cosecha (%)	0,64 (56 días)					1,54 (63 días)		

Predio 7 VI Región

Parámetros	pre-cosecha 2015-2016		floración 2016-2017		pre-cosecha 2016-2017		floración 2017-2018		pre-cosecha 2017-2018	
	fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid
Sensibilidad EC ₅₀ (µg/ml)	19,79	25,21	26,62	51,06	13,00	0,78	9,38	24,09	29,74	69,73
% aislados resistentes	92,00	25,00	83,00	50,00	100,00	0,00	67,00	24,00	85,00	69,00
% aislados sensibles	8,00	75,00	17,00	50,00	0,00	100,00	33,00	76,00	15,00	31,00
Erg27 % aislados sensibles	16,67	----	16,67	----	0,00	----	66,67	----	30,77	----
P225 % aislados sensibles	----	91,67	----	100,00	----	100,00	----	94,44	----	84,62
H272 % aislados sensibles	----	100,00	----	50,00	----	100,00	----	33,33	----	46,15
Infección en post-cosecha (%)	0,60 (29 días)		0,59 (44 días)				0,69 (49 días)			

Predio 8

Tratamiento	Caliptra Rajada	Inicio de Flor	Plena Flor	Termino de Flor	Entre	Cierre de Racimo	Pre Envero	Envero	Pre Cosecha 1	Pre Cosecha 2
2	Trichonativa	Switch	cantus	Serifel	Trichonativa	Serifel	Bellis	Switch	Serifel	Teldor

	Parámetros	floración 2017-2018		pre-cosecha 2017-2018	
		fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid
T2	Sensibilidad EC ₅₀ (µg/mL)	15,68	81,98	18,06	82,06
	% aislados resistentes	100,00	82,00	100,00	82,00
	% aislados sensibles	0,00	18,00	0,00	18,00
	Erg27 % aislados sensibles	16,67	----	0,00	----
	P225 % aislados sensibles	----	66,67	----	0,00
	H272 % aislados sensibles	----	50,00	----	100,00
	Infección en post-cosecha (%)	0,64 (54 días)			

	Parámetros	floración 2016-2017		pre-cosecha 2016-2017		floración 2017-2018		pre-cosecha 2017-2018	
		fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid
TDC	Sensibilidad EC ₅₀ (µg/mL)	6,44	72,52	15,29	96,44	8,22	100,00	33,04	100,00
	% aislados resistentes	61,00	72,00	94,00	100,00	75,00	100,00	88,00	100,00
	% aislados sensibles	39,00	28,00	6,00	0,00	25,00	0,00	12,00	0,00
	Erg27 % aislados sensibles	55,56	----	5,56	----	8,33	----	18,18	----
	P225 % aislados sensibles	----	66,67	----	50,00	----	100,00	----	100,00
	H272 % aislados sensibles	----	77,78	----	50,00	----	0,00	----	0,00
	Infección en post-cosecha (%)	0,92 (61 días)					2,01 (54 días)		

Predio 9 VI Región

Tratamiento	Caliptra Rajada	Inicio de Flor	Plena Flor	Termino de Flor	Entre	Cierre de Racimo	Pre Envero	Envero	Pre Cosecha 1	Pre Cosecha 2
1	Trichonativa	Kenja 400 SC	Switch	Kamuy	Trichonativa	Timorex Gold	Bellis	Switch	Timorex Gold	Teldor

	Parámetros	floración 2017-2018		pre-cosecha 2017-2018	
		fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid
T1	Sensibilidad EC ₅₀ (µg/mL)	15,35	34,98	19,77	50,18
	% aislados resistentes	58,00	33,00	42,00	50,00
	% aislados sensibles	42,00	67,00	58,00	50,00
	Erg27 % aislados sensibles	33,33	----	58,33	----
	P225 % aislados sensibles	----	100,00	----	50,00
	H272 % aislados sensibles	----	66,67	----	100,00
Infección en post-cosecha (%)		0,43 (45 días)			

	Parámetros	floración 2016-2017		pre-cosecha 2016-2017		floración 2017-2018		pre-cosecha 2017-2018	
		fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid
TDC	Sensibilidad EC ₅₀ (µg/mL)	7,66	85,35	15,15	70,19	22,31	100,00	25,02	25,24
	% aislados resistentes	56,00	94,00	94,00	71,00	88,00	100,00	44,00	25,00
	% aislados sensibles	44,00	6,00	6,00	29,00	12,00	0,00	56,00	75,00
	Erg27 % aislados sensibles	44,44	----	11,11	----	16,67	----	55,56	----
	P225 % aislados sensibles	----	72,22	----	77,78	----	100,00	----	100,00
	H272 % aislados sensibles	----	38,89	----	50,00	----	0,00	----	66,67
Infección en post-cosecha (%)		1,36 (48 días)				0,56 (45 días)			

Predio 10 VI Región

Tratamiento	Caliptra Rajada	Inicio de Flor	Plena Flor	Termino de Flor	Entre	Cierre de Racimo	Pre Envero	Envero	Pre Cosecha 1	Pre Cosecha 2
4	Trichonativa	Switch	Luna Tranquility	Timorex Gold	Trichonativa	Timorex Gold	Bellis	Switch	Serenade ASO	Teldor

	Parámetros	floración 2017-2018		pre-cosecha 2017-2018	
		fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid
T4	Sensibilidad EC ₅₀ (µg/mL)	51,62	64,27	21,43	100,00
	% aislados resistentes	70,00	64,00	100,00	100,00
	% aislados sensibles	30,00	36,00	0,00	0,00
	Erg27 % aislados sensibles	41,67	----	0,00	----
	P225 % aislados sensibles	----	100,00	----	100,00
	H272 % aislados sensibles	----	41,67	----	25,00
	Infección en post-cosecha (%)	0,03 (69 días)			

	Parámetros	pre-cosecha 2015-2016		pre-cosecha 2016-2017		floración 2017-2018		pre-cosecha 2017-2018	
		fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid	fenhexamid	boscalid
TDC	Sensibilidad EC ₅₀ (µg/mL)	17,52	59,13	22,29	100,00	43,10	80,10	20,23	100,00
	% aislados resistentes	67,00	58,00	100,00	100,00	50,00	80,00	92,00	100,00
	% aislados sensibles	33,00	42,00	0,00	0,00	50,00	20,00	8,00	0,00
	Erg27 % aislados sensibles	50,00	----	0,00	----	58,33	----	8,33	----
	P225 % aislados sensibles	----	83,33	----	100,00	----	100,00	----	100,00
	H272 % aislados sensibles	----	69,57	----	83,33	----	8,33	----	8,33
	Infección en post-cosecha (%)	0,05 (36 días)		0,28 (60 días)		0,11 (69 días)			

Unidad Ejecutora

Lab. de Fitopatología Frutal y Molecular,
Depto. De Sanidad Vegetal,
Fac. De Cs. Agronómicas
Universidad de Chile

Director del proyecto:

Ing. Agr. Mg. Cs. **Marcela Esterio G.**

Director alterno del proyecto:

Ing. Agr. MS. Ph.D. **Jaime Auger S.**

Ejecutor trabajos de laboratorio:

Ing. Agr. Mg. Cs. **Charleen Copier A.**

Ejecutor Trabajos de Terreno:

Ing. Agr. **Mauricio Rubilar R.**

Apoyo Trabajos de terreno y Laboratorio:

Lic. Cs. Agr. **Aarón Hermosilla F.**

Apoyo trabajos de Laboratorio Molecular:

Lic. Ing. y Biotec. **Claudio Osorio N.**

Apoyo en Gestión y Transferencia Tecnológica:

Ing. Agr. **Valeria Tessada**

Informaciones en:

Facultad de Ciencias Agronómicas

Entidades Asociadas

FEDEFruta F.G.

Del Monte Fresh Chile Produce S.A.

Martinez y Valdivieso S.A.

Bio Insumos Nativa SpA.

Basf Chile S.A.

Bayer S.A.

Summit-Agro Chile SpA.

Syngenta S.A.

Valent BioSciences Chile S.A.

Liceo Agrícola Juan Pablo II / Ilustre

Municipalidad de Nancagua

Sociedad Agrícola La Hornilla SpA.

Agrícola Santa Teresita Ltda.

Comercial y Frutícola de La Fuente Ltda.

René Alberto Valle Villa

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
DEPARTAMENTO DE SANIDAD VEGETAL



PROYECTO FIA, PYT-2016-0243

“Diseño de Programas de Control de *Botrytis cinerea* medioambientalmente sustentables según sensibilidad a fungicidas base, determinados por qPCR y la incorporación de fungicidas no residuales” 2016-2018



Fundación para la
Innovación Agraria
MINISTERIO DE AGRICULTURA

Introducción

La uva de mesa es la principal especie del rubro frutícola del país y la Pudrición Gris causada por *Botrytis cinerea* el problema fitopatológico más importante que la afecta y su manejo considera prácticas culturales y control químico en los períodos críticos de infección (floración, y desde pre-envero a cosecha), pero debido a la gran variabilidad genética y gran capacidad de generar resistencia a fungicidas que presenta el hongo, no siempre se logra el éxito esperado.

Actualmente, las moléculas fungicidas base del control de botrytis son la mezcla cyprodinil & fludioxonil (Switch) y las pertenecientes a la Clase III de los inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (SBI), hydroxianilidas (fenhexamid) y amino-pyrazolinonas (fenpyrazamine), y las Carboxamidas, inhibidores de la biosíntesis de la succinato deshidrogenasa (SDHI): boscalid, fluopyram e isofetamida, entre otras).

La pérdida de sensibilidad a estos últimos dos grupos está asociada a la presencia de mutaciones en el sitio de acción de estas moléculas. En boscalid, las mutaciones más frecuentemente detectadas corresponden a H272R/Y/L (52,8%, 35,42% y 2,1%, respectivamente) presentes en zonas no conservadas del ADN del hongo y P225L (6,25%) y P225H (4,16%) en zonas conservadas, y que son más difíciles de eliminar si no se diseña un Programa de Control adecuado.

Actualmente, los productores están bastante familiarizados con los monitoreos de sensibilidad a fungicidas, pero los resultados de estos análisis no les permiten realizar en forma oportuna los cambios en los programas de control ya que no indican a qué causa específica (mutación), se asocia la pérdida de sensibilidad como tampoco, la frecuencia de este cambio (mutación) en la población.

Las herramientas de diagnóstico a desarrollarse en el presente proyecto, técnica qPCR-Múltiple, de única Sonda, permitirán determinar cuál o cuáles son las mutaciones más frecuentemente asociadas a la pérdida de sensibilidad a fenhexamid y a boscalid y su frecuencia, en predios de distinta condición de sensibilidad inicial a éstos: (i) sensible, (ii) resistente a fenhexamid, (iii) resistente a boscalid y (iv) resistente a ambos, y con ello optimizar el uso de los fungicidas base, protegiendo su eficacia, mediante la incorporación en épocas específicas de antagonistas biológicos (*Trichoderma* spp., *Bacillus subtilis*, y *Bacillus amyloliquefaciens* y de moléculas alternativas fungicidas no residuales (*Melaleuca alternifolia*).



Objetivo General

- Desarrollar programas sustentables de control de Botrytis en uva de mesa de exportación según condición de sensibilidad a moléculas fungicidas claves, determinadas tempranamente, mediante técnicas moleculares (qPCR múltiple) e incorporación de moléculas botryticidas no residuales en las principales zonas productoras del país.

Objetivos específicos

- Desarrollar e implementar técnicas de detección temprana de pérdida de sensibilidad a Carboxamidas (qPCR-Múltiple-FMCA).

-Optimizar la herramienta de qPCR para la detección de mutaciones que confieren resistencia a hydroxianilidas (qPCR-FMCA).

-Determinar sensibilidad a carboxamidas e hydroxianilidas mediante estas técnicas, validando su eficiencia mediante secuenciación y análisis microbiológicos tradicionales de sensibilidad e infección en muestras obtenidas desde los predios seleccionados. (Temporada 1).

-Evaluar en aislados de distinto nivel de sensibilidad a carboxamidas e hydroxianilidas la efectividad de moléculas alternativas medioambientalmente amigables para el control de Botrytis y en base al nivel de sensibilidad a los fungicidas químicos diseñar Programas de control de Botrytis piloto (Premium).

-Selección de Programas Premium evaluando la eficacia de los programas de control piloto aplicados (Temporada 2) en los predios seleccionados, mediante la determinación de los niveles de infección de Botrytis y condición de sensibilidad a fungicidas utilizando las herramientas de innovación.

-Difundir los resultados del proyecto a beneficiarios finales de las zonas productoras (Región Metropolitana y, V y VI Regiones).

Aplicabilidad e implicancias de los resultados

Como se espera que el uso de la técnica genere un mejor resultado económico y mejores retornos a nivel productor, el costo involucrado en el uso de esta innovación será factible de ser incorporada por ellos, asegurándose de esta forma la optimización de la producción de este cultivo y de otros que también se afectan por Botrytis a nivel regional y a nivel país.

Anexo 5. Confirmación de recepción de Publicación Científica enviada a International Journal of Food Microbiology

The image shows a screenshot of a Gmail inbox. The email is from Elsevier (Evisesupport@elsevier.com) to 'para mi'. The subject line is 'Successfully received: submission Increase of aggressiveness levels in fenhexamid resistant (HydR3+) Botrytis cinerea phenotypes carrying erg27 gene mutations from table grape in Chile for International Journal of Food Microbiology'. The email content includes a reference number (FOOD_2018_262), the title of the submission, and a confirmation message from the journal editor. It also provides instructions on how to track the manuscript status via the EVISE website and offers customer support options. The footer contains copyright information for Elsevier B.V. in 2018.

Successfully received: submission Increase of aggressiveness levels in fenhexamid resistant (HydR3+) Botrytis cinerea phenotypes carrying erg27 gene mutations from table grape in Chile for International Journal of Food Microbiology

International Journal of Food Microbiology - Evisesupport@elsevier.com
para mi

15:46 (hace 0 minutos)

Traducir mensaje

Desactivar para inglés

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: FOOD_2018_262
Title: Increase of aggressiveness levels in fenhexamid resistant (HydR3+) Botrytis cinerea phenotypes carrying erg27 gene mutations from table grape in Chile
Journal: International Journal of Food Microbiology

Dear Ms. ESTERIO,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in International Journal of Food Microbiology. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/acesNavigationNavController.jspx?_afRNL_ACR=FOOD and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

International Journal of Food Microbiology

Have questions or need assistance?
For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/6 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V.

15. Bibliografía Consultada

- 1) Esterio, M., Araneda, M.J., Román, A., Pizarro, L., Copier, Ch. and Auger, J. 2015. First report of boscalid resistant *B. cinerea* isolates carrying the mutations H272R, H272Y, P225L and P225H from table grape in Chile. *Plant Disease*. 66(9):891.
- 2) Fernández-Ortuño, D., Vielba-Fernández A., Pérez-García, A., Torés J. A. and de Vicente A., 2018. First Report of Fenpyrazamine Resistance in *Botrytis cinerea* from Strawberry Fields in Spain. *Plant Health progress*. 19(1):45.
- 3) Lalève, A., Gamet, S., Walker, A., Debieu, D., Toquin, V., Fillinger, S., 2013. Site-directed mutagenesis of the P225, N230 and H272 residues of succinate dehydrogenase subunit B from *Botrytis cinerea* highlights different roles in enzyme activity and inhibitor binding. *Environ. Microbiol.* 1462–2920.
- 4) Leroux, P., M. Gredt, M. Leroch, and A. Walker. 2010. Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 6615-6630.
- 5) Sierotzki, H., J. Wullschleger and U. Gisi. 2000. Point mutation in cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* field isolates. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 68(2): 107–112.